Untersuchungen zur biologischen Modifikation der Bafilomycine

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Blank
aus Riedlingen

1987

UNIV.
LIBR.
IRL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0045

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOLOGISCHEN MODIFIKATION DER BAFILOMYCINE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
WOLFGANG BLANK
aus Riedlingen

1987

Tag der mündlichen Prüfung:	21. August 1987
Dekan:	Prof. Dr. W. Engels
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Winkelmann

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die großzügige Förderung danke ich Herrn Prof. Dr. H. Zähner herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn A. Zagst für seine engagierte und gewissenhafte Mitarbeit. Herrn Dipl.-Biol. M. Brandl möchte ich für die stets gute und anregende Zusammenarbeit im Labor danken.

Herrn Prof. Dr. W. Keller-Schierlein (Institut für Organische Chemie, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich) sowie Herrn Dr. M. Deeg und Herrn H. Bittmann (Institut für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen) danke ich für die Arbeiten zur Strukturaufklärung der Bafilomycine.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG 1

2. MATERIAL UND METHODEN 8

2.1. Chemikalien 8

2.2. Nährmedien 9
2.2.1. Medien für Stammhaltung und Testplatten 9
2.2.2. Produktionsmedien 11
2.2.3. Medien für Protoplastierung und Plasmid-Isolierung 11
2.2.4. Puffer 12
2.2.5. Konzentration der Supplemente in den Medien 12

2.3. Mikroorganismen 13
2.3.1. Bafilomycin-Produzenten 13
2.3.2. Andere Makrolid-Produzenten 13
2.3.3. Plasmid-tragende Stämme 13
2.3.4. Testorganismen 14
2.3.4.1. Bakterien 14
2.3.4.2. Pilze 15

2.4. Kulturbedingungen für die Bafilomycin-Produzenten 16
2.4.1. Stammhaltung 16
2.4.2. Herstellung einer Sporensuspension 16
2.4.3. Schüttelkolbenversuche 17
2.4.4. 'resting cell'-Versuche 17
2.4.5. Fermentation 17

2.5. Untersuchung der Fermentationsproben 18
2.5.1. Bestimmung des Trockengewichts 18

Seite

2.5.2. Mannitbestimmung 18
2.5.3. Bestimmung von Phenylalanin 19
2.5.4. Phosphat-Bestimmung 19
2.5.5. Ammonium-Bestimmung 20

2.6. Bestimmung der Bafilomycine und anderer Makrolide 20
2.6.1. Plattendiffusionstest 20
2.6.2. Dünnschichtchromatographie 20
2.6.3. HPLC-Analyse der Bafilomycine 20
2.6.4. HPLC-Analyse von Avermectinen, Milbemycinen, Venturicidin A und B, Tetracenomycin C 22

2.7. Isolierung und Charakterisierung neuer Bafilomycine 23
2.7.1. Aufarbeitung 23
2.7.2. UV-Spektren 23
2.7.3. Vergleichendes Wirkungsspektrum 24
2.7.4. Nematoden-Test 24
2.7.5. Hemmung der Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere 25

2.8. Protoplastierung 25
2.8.1. Protoplastierung und Regeneration 25
2.8.2. Protoplastenfusion 26

2.9. Plasmidisolierung 27
2.9.1. Quantitative Bestimmung der DNA 27
2.9.2. Restriktionsverdau 27
2.9.3. Agarosegelelektrophorese 27

2.10. Transformation 28

2.11. Mutagenese 29
2.11.1. Isolierung von auxotrophen Mutanten 29
2.11.2. Isolierung von Bafilomycin-Nichtproduzenten 29

Seite

3. ERGEBNISSE 30

3.1. Nachweis der Bafilomycine 30

3.2. Isolierung und Charakterisierung von Mutanten .. 31

3.3. Versuche zur Biomodifikation der Bafilomycine .. 33
3.3.1. 'resting cell'-System 34
3.3.2. Gerichtete Fermentation 34
3.3.2.1. Verfütterung von verzweigtkettigen Aminosäuren . 34
3.3.2.2. Verfütterung von α-Ketosäuren 40
3.3.2.3. Verfütterung aromatischer Vorstufen 41
3.3.2.4. Verfütterung von Phosphoglyceriden 45
3.3.2.5. Kombination von Verfütterungseffekten 46
3.3.2.6. Übertragbarkeit der Ergebnisse 48
3.3.3. Blockierung der Methylierung 51
3.3.4. Versuche zur Produktion von Hybrid-Antibiotika . 53
3.3.4.1. Protoplastierung der Makrolid-Produzenten 53
3.3.4.2. Transformation von Str. griseus 57
3.3.4.3. Protoplastenfusion 61

3.4. Wirkung von Bafilomycin-Derivaten 63
3.4.1. Wirkungsspektrum 63
3.4.2. Wirkung gegen Nematoden 67
3.4.3. Inhibition der Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere 68

4. DISKUSSION 69

4.1. Biosynthese der Bafilomycine 69

4.2. Gerichtete Fermentation 72

4.3. Blockieren der Biosynthese 77

4.4. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Streptomyceten 78

Seite

4.5. Versuche zur Bildung von Hybrid-Antibiotika.... 79
4.5.1 Protoplastierung und Protoplastenfusion..... 80
4.5.2 Transformation..... 82

4.6. Wirksamkeit von Bafilomycinen und Derivaten.... 83

4.7. Ausblick..... 85

5. ZUSAMMENFASSUNG..... 87

6. LITERATUR..... 88

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
Akt.	Aktivität
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Baf.	Bafilomycine
Bakt.	Bakterien
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
CGA	Cyclopropylglyoxylsäureamid
DC	Dünnschichtchromatographie
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen
EMS	Ethylmethansulfonat
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule
HH	Hemmhof
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LPPLC	Low Pressure Preparative Liquid Chromatography
mAU	maximal Absorbance Units
MHK	Minimale Hemmkonzentration
n.b.	nicht beschrieben
n.g.	nicht getestet
NTG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
OD	Optische Dichte
ONA	α-Oxononansäureamid
P-Puffer	Protoplastierungspuffer
PEG	Polyethylenglycol
PGS	Phenylglyoxylsäure
RC	resting cell
R_f	ratio of frontiers
Str	Streptomycin
t (h)	Fermentationszeit in Stunden
Tab.	Tabelle
TBA-	Tetrabutylammonium-
Tcm	Tetracenomycin
Temp.	Temperatur

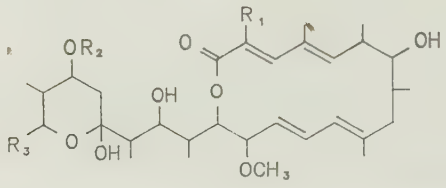
TES	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-amino-ethan-sulfonsäure
TG	Trockengewicht
Tü	Stammsammlung des Instituts für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie 1, Universität Tübingen
unbew.	unbeweglich
UpM	Umdrehungen pro Minute
Verh.	Verhältnis
vvm	Volumen Luft pro Volumen Nährlösung pro Minute

1. EINLEITUNG

'Einer der Schlüssel zur Entdeckung neuer Strukturen aus Mikroorganismen ist der Glaube daran, daß Mikroorganismen jede gewünschte Substanz produzieren können.' (OMURA, 1986a)

Die Zahl der jährlich neu entdeckten Antibiotika nimmt von Jahr zu Jahr zu (OMURA, 1986a). Diese Entwicklung ist außer auf den festen Glauben an die Begabung der Mikroorganismen auf die Entwicklung neuer Screeningmethoden, auf verfeinertere Auswahlkriterien bei der Suche nach neuen Verbindungen und auf empfindlichere Nachweissysteme zurückzuführen, ganz erheblich aber auch auf die wachsende Bedeutung der biologischen oder chemischen Modifikation bereits bekannter Verbindungen. Denn trotz intelligenterer Testsysteme und ständig steigendem Aufwand werden im Screening nach biologisch aktiven Substanzen aus Mikroorganismen häufig bereits bekannte Substanzgruppen wiedergefunden (ZÄHNER & DRAUTZ, 1985).

Aus allein sechs Tübinger Streptomyceten-Stämmen konnten bislang Bafilomycine isoliert werden. Diese gehören zu einer eng verwandten Gruppe Makrolid-ähnlicher Verbindungen, die mehreren Arbeitsgruppen innerhalb kurzer Zeit in unterschiedlichen Testsystemen begegneten (Abb. 1a - c). Die Bafilomycine wurden von HENSENS et al. (1983) als Na^+K^+-ATPase-Inhibitoren, von WERNER et al. (1983, 1984) und MEYER et al. (1985) als antifungische Substanzen und von KRETSCHMER et al. (1985) als insektizid wirkende Verbindungen isoliert und beschrieben. Das Leucanicidin, ein Bafilomycin-Glykosid, wurde auf Grund seiner larviziden Eigenschaften gefunden (ISOGAI et al., 1984). Der von GOETZ et al. (1985) beschriebene Metabolit L-155,175 wirkte antiparasitisch. Aus einem Screening auf antitumoraktive Substanzen aus Streptomyceten gingen die den Bafilomycinen nah verwandten Hygrolidine (SETO et al., 1982,



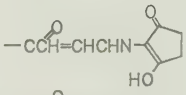
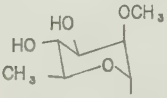
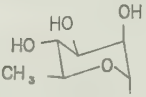
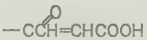
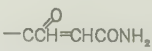
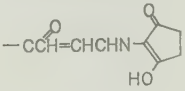
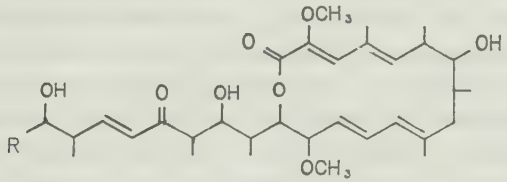
	R_1	R_2	R_3
Bafilomycin A_1	OCH_3	H	
Bafilomycin B_1	OCH_3		
Bafilomycin C_1	OCH_3		
Leucanicidin	OCH_3		
Bafilomycin-A_1-21-O-(α-L-rhamnopyranosid)	OCH_3		
Defumarylhygrolidin	CH_3	H	CH_2CH_3
Hygrolidin	CH_3		CH_2CH_3
Hygrolidinamid	CH_3		CH_2CH_3
L-155,175	CH_3		CH_2CH_3

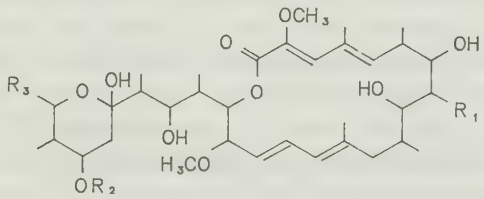
Abb. 1a: 16-gliedrige, ungewöhnliche Makrolide (Bafilomycine, Hygrolidine) mit Tetrahydropyranring



R R

PD 118,576	CH_2CH_3	Bafilomycin D	$CH(CH_3)_2$

Abb. 1b: 16-gliedrige, ungewöhnliche Makrolide (PD 118,576, Bafilomycin D) ohne Tetrahydropyranring



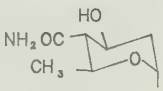
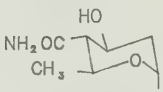
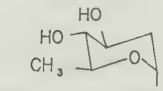
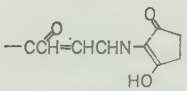
	R_1	R_2	R_3
Concanamycin A	CH_2CH_3		$CH=CHCH_3$
Concanamycin B	CH_3		$CH=CHCH_3$
Concanamycin C	CH_2CH_3		$CH=CHCH_3$
Virustomycin A	CH_2CH_3		$CH=CHCH_3$

Abb. 1c: 18-gliedrige, ungewöhnliche Makrolide (Concanamycine, Virustomycin A) mit Tetrahydropyranring

1984) und die Verbindung PD 118,576 (WILTON et al., 1985) hervor. KINASHI et al. (1981a, b) fielen die Concanamycine durch ihre immunsuppressive Wirkung auf, das Concanamycin C ist mit dem schon 1960 von einer japanischen Arbeitsgruppe beschriebenen Folimycin (YAMAMOTO et al., 1960) identisch (KINASHI et al., 1984). OMURA et al. (1982a, 1983a) fanden das Virustomycin A in einem Testsystem auf Grund seiner Wirkung gegen Trichomonaden.

Im Gegensatz zu den klassischen Makroliden enthalten die Vertreter dieser Gruppe keinen O-glykosidisch an den Lactonring gebundenen Zucker (WOODWARD, 1957), sondern sind am 16- oder 18-gliedrigen Lactonring über eine C-Kette unterschiedlich substituiert. Von Interesse sind die Verbindungen durch ihre breite biologische Aktivität (Tab. 1), die sie von den nur antibakteriell wirksamen, klassischen Makroliden unterschei-

Tab. 1: Biologische Aktivität ungewöhnlicher Makrolide aus Streptomyceten

Substanzgruppe	Biologische Aktivität		
	Bakt.	Pilze	Sonstige Aktivität
Bafilomycine	-	+	antiparasitisch, insektizid, ATPase-Inhibitor, immunsuppressiv, ionophor
PD 118,576	(-)	(-)	hemmt lymphozytäre Leukämie, HCT-8 Adenocarcinom
L-155,175	n.b.	n.b.	antiparasitisch
Hygrolidin	-	+	gegen SV 40-transformierte C-3H-2K-Zellen aktiv
Concanamycin A	-	+	larvizid, immunsuppressiv, cytotoxisch
Virustomycin A	-	+	RNA-, DNA-Viren, Trichomonaden

det. Von der mit dem Bafilomycin C_1 identischen Verbindung L-681,110 wurde berichtet, daß sie ähnlich wie Avermectin zu einer Freisetzung von γ-Aminobuttersäure am Synaptosom führte. Sie wirkte außerdem als Inhibitor der Na^+K^+-ATPase und hatte antiparasitische und insektizide Eigenschaften (HUANG et al., 1984). WILTON et al. (1985) fanden mit PD 118,576 eine sehr ähnliche Verbindung, die nur noch schwach antibakteriell und antifungisch, jedoch gegen menschliche Tumorzellinien aktiv war. Die Substanz unterschied sich nur durch den offenen Tetrahydropyranring von L-681,110 und den Bafilomycinen. Mit der breiten biologischen Wirksamkeit geht eine hohe Toxizität der Verbindungen einher. Die an der Maus ermittelten LD_{50}-Werte liegen für Bafilomycine und Concanamycine im Bereich von ca. 10 mg/kg (BAUMGARTNER, 1985).

Bei der Untersuchung der biologischen Wirksamkeit der Bafilomycine war aufgefallen, daß geringe strukturelle Unterschiede zu einer veränderten biologischen Wirkung führten (BAUMGARTNER, 1985, DEEG, 1986). Deshalb wurde versucht, die starke Toxizität der Substanzklasse durch chemische oder biologische Modifikation von der guten insektiziden Wirkung zu trennen. Bei der chemischen Modifikation zeigte sich, daß am Bafilomycin-Molekül nur wenige Stellen einer chemischen Derivatisierung zugänglich waren (DEEG, 1986, DEEG et al., 1987, BITTMANN, 1987). Dagegen schienen die Bafilomycine als Makrolide für eine biologische Modifikation gut geeignet.

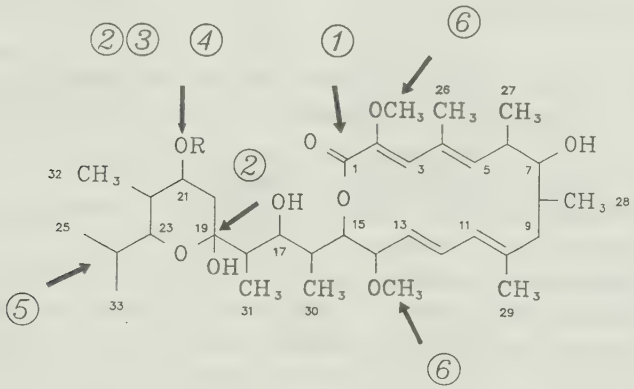
Bei der biologischen Modifikation von Antibiotika unterscheiden MARSHALL & WILEY (1986) zwischen der direkten Transformation, bei der komplett synthetisierte Antibiotika durch Mikroorganismen oder enzymatisch verändert werden, und der indirekten Transformation, die durch den Eingriff in die Biosynthese der Verbindungen zu modifizierten Substanzen führen soll. Vertreter aller wichtigen Antibiotikagruppen konnten durch Mikroorganismen oder mikrobielle Enzyme erfolgreich biologisch modifiziert werden. Im klinischen Einsatz befindliche Verbindungen aus der Gruppe der klassischen Makrolide

(14- und 16-gliedrige Makrolide) sind zumeist durch direkte Transformation veränderte Derivate (OMURA, 1984). Die indirekte Transformation greift auf verschiedenen Wegen in die Antibiotika-Biosynthese ein: Die gerichtete Fermentation wurde schon bei der Penicillin-Fermentation zur Produktion von Verbindungen mit variierten Seitenketten eingesetzt (DEMAIN, 1981). Seither konnten durch Vorstufen-Verfütterung zahlreiche analoge Verbindungen gefunden werden: Beispiele dafür sind die Novobiocine, Echinomycine, Pyrrolnitrine, Polyoxine, Phleomycine, Bleomycine, Actinomycine, Tyrocidine, Tallysomycine, Tetracycline, Lincomycine, Celestosaminide, Viridogriseine und Indolmycine (CLARIDGE et al., 1986). Auch Versuche, durch Zufütterung von Antagonisten oder auf genetischem Weg gezielt die Antibiotika-Biosynthese zu blockieren, wurden bei verschiedenen Antibiotika-Gruppen erfolgreich angewendet. Die Kombination der gerichteten Fermentation und des Blockierens von Biosynthesewegen führte dann zur Mutasynthese (BIRCH, 1963). Versuche, durch genetische Rekombination verschiedener Antibiotika-Produzenten zu Hybridantibiotika-Bildnern zu gelangen (HOPWOOD & CHATER, 1980, HOPWOOD, 1981a) waren erst mit der Entwicklung der PEG-vermittelten Protoplastenfusion (HOPWOOD et al., 1977, BALTZ, 1978) und der Protoplastentransformation durch BIBB et al. (1978, 1980) möglich. Bis 1977 war die Konjugation bei Streptomyceten die einzige Rekombinationsmethode.

Für eine indirekte Transformation der Bafilomycine boten sich mehrere Stellen im Molekül an (Abb. 2):

1) Das Startermolekül der Polyketidkette (C_{23}).
2) Das C-Atom 21, an dieser Stelle werden die Bafilomycine vom Produzenten variiert.
3) Die am C_2 und C_{14} nachträglich eingeführten Methylgruppen.
4) Denkbar wäre auch eine Veränderung der Polyketidkette selbst, entweder durch Anbieten hoher Konzentrationen an Acyl-Vorstufen an den Wildstamm oder an Acetat- oder Propionat-auxotrophe Mutanten.

5) Eine unspezifische Modifikation des Moleküls durch Rekombination der Bafilomycin-Produzenten mit anderen Makrolid-Bildnern über Protoplastenfusion oder Transformation.



Chemische Derivatisierung:

① Alkalische Hydrolyse
② O–Alkylierung
③ O–Acylierung

Biologische Derivatisierung:

④ ⑤ Natuerliche Variation, Gerichtete Fermentation Mutanten
⑥ Gerichtete Fermentation, Analog–resistente M.
? Protoplastenfusion
Transformation

Abb. 2: Möglichkeiten zur biologischen oder chemischen Derivatisierung am Bafilomycin-Molekül.

Aufgabe dieser Arbeit war es, die von Streptomyces griseus Tü 2599 gebildeten Bafilomycine auf biologischem Weg mit den beschriebenen Methoden zu modifizieren. Die modifizierten Substanzen sollten isoliert und charakterisiert werden .

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden analysenreine Substanzen der Firma Merck AG, Darmstadt, verwendet.

(1) Deutsche Ajinomoto GmbH, Hamburg
(2) Bethesda Research Laboratories Inc., Rockville, USA
(3) Boehringer, Mannheim
(4) BP-Chemicals, Düsseldorf
(5) Degussa AG, Hanau
(6) Difco Laboratories, Detroit, USA
(7) Fluka AG, Buchs, Schweiz
(8) Hedinger, Stuttgart
(9) Hellmuth Carroux GmbH, Hamburg
(10) Deutsche Maizenawerke, Hamburg
(11) Nattermann, Köln
(12) Oxoid Deutschland, Wesel
(13) Rohm & Haas Comp., Philadelphia, PA, USA
(14) Schoenenberger, Magstadt
(15) Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg
(16) Sigma Chemie GmbH, München
(17) E.R. Squibb & Sons, Princeton, NJ, USA

Agarose	(2)	Hefeextrakt	(12)
ATP, Di-Natrium-Salz	(3)	Hyphlo Supercel (Celit)	(8)
ATPase (Hundeniere)	(16)	L-Isoleucin	(1)
Bacto-Agar	(6)	Kaffeesäure	(7)
Cyclopropylglyoxylsäureamid	(5)	α-Ketotridecansäureamid	(5)
Ethidiumbromid	(15)	Lysozym	(15)
Ethionin	(7)	Malzextrakt	(12)
Ferulasäure	(7)	D-Mannit	(10)
Furylglyoxylsäure	(5)	Natriumdodecylsulfat	(15)
D-Glucose	(10)	Nutrient Broth	(6)

α-Oxononansäureamid	(5)	TES	(15)
PEG 1550	(15)	Tetrabutylammoniumchlorid	(7)
Peptone iron agar	(5)	Thiostrepton	(17)
Phenylglyoxylsäure	(6)	Trimethylpyruvat	(7)
Phosphatidylcholin	(11)	Tryptic Soy Broth	(6)
Polyol PPG 2025	(4)	Tween 80	(7)
Restriktionsenzyme	(3)	XAD-Adsorberharze	(13)
Sojalecithin	(11)	Yeast Nitrogen Base	(8)
Sojamehl, vollfett	(14)	Zimtsäure	(7)
Spanagar	(9)	Zimtsäureethylester	(7)
Sulfadiazin	(16)		

Für die Überlassung von Virustomycin A danke ich Herrn Prof. Dr. Omura, The Kitasato Institute and School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo, für Tetracenomycin C Herrn Prof. Dr. A. Zeeck, Universität Göttingen.

2.2. Nährmedien

Alle Medien wurden nach dem Einstellen des pH-Wertes mit 1 N NaOH bzw. 1 N H_2SO_4 20 Minuten bei 121°C sterilisiert. Festen Nährböden wurde, wenn nicht anders beschrieben, vor dem Autoklavieren 20 g Agar/l zugesetzt, wobei für komplexe Nährmedien Spanagar, für chemisch definierte Medien Bacto-Agar verwendet wurde. Die mit *) bezeichneten Bestandteile wurden als Stammlösung getrennt autoklaviert.

2.2.1. Medien für Stammhaltung und Testplatten

Medium 1 (NB-Medium)		Medium 2 (MA-Medium)	
Nutrient Broth	8.0 g	Malzextrakt	20.0 g
Leitungswasser	1000 ml	Leitungswasser	1000 ml

Medium 3 (HA-Medium)	
Hefeextrakt	4.0 g
Malzextrakt,	10.0 g
D-Glucose	4.0 g
Leitungswasser	1000 ml
pH 7.3	

Medium 4 (YNB-Medium)	
Yeast Nitrogen Base	1.7 g
$(NH_4)_2SO_4$	5.0 g
Leitungswasser	1000 ml

Medium 5 (DM-Medium)	
KH_2PO_4	3.0 g
K_2HPO_4	7.0 g
NaCl	0.1 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
D-Glucose *)	4.0 g
A. ention.	1000 ml
pH 7.2	

Medium 6 (Clostridien-Medium)	
Fleischextrakt	3.0 g
Malzextrakt	3.0 g
Hefeextrakt	3.0 g
Pepton	20.0 g
Ascorbinsäure	0.2 g
D-Glucose *)	5.0 g
A. ention.	1000 ml
pH 7.0	

Medium 7 (Ox-Medium)	
Fleischextrakt	10.0 g
Pepton	10.0 g
Leitungswasser	1000 ml
pH 7.2	

Medium 8 (TIC-Medium)
nach KNIPPERS (1966)

Medium 9 (Minimalmedium)	
L-Asparagin	0.5 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.2 g
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0.01 g
D-Glucose *)	10.0 g
A. ention.	1000 ml

Medium 10 (PIA-Agar)	
Peptone iron agar	36.0 g
Agar	5.0 g
A. ention.	1000 ml

2.2.2. Produktionsmedien

Medium 11 (Nährlösung 19)	
Sojamehl	20.0 g
Mannit	20.0 g
Leitungswasser	1000 ml
pH 7.5	

Medium 12 ('resting cell'-Medium))	
Mannit	20.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	0.16 g
TES	50 mM
Spurenelementlösung	2 ml
Leitungswasser	1000 ml
pH 7.5	

2.2.3. Medien für Protoplastierung und Plasmidisolierung

Medium 13 (Anzuchtmedium S)	
Pepton	4.0 g
Hefeextrakt	4.0 g
$MgSO_4$	0.5 g
KH_2PO_4	2.0 g
K_2HPO_4	4.0 g
D-Glucose *)	10.0 g
Leitungswasser	1000 ml
pH 7 - 7.2	

Medium 14 (Regenerationsmedium, R3)	
Saccharose	103.0 g
Glucose	10.0 g
Pepton	4.0 g
Hefeextrakt	4.0 g
KCl	0.5 g
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	8.1 g
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	2.2 g
A. bidest.	ad 880 ml
K_2HPO_4 *)	20 ml
TES (0.25 M, pH 7.2)*)	100 ml

Medium 15 (nach PIGAC, 1982)	
Saccharose	100.0 g
Tryptic Soy Broth	30.0 g
Hefeextrakt	10.0 g
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	10.12 g
A. ention.	ad 980 ml
$CaCl_2$ (7.68 %) *)	20 ml

Medium 16 (Soft nutrient agar)	
Nutrient Broth	8.0 g
Agar	3.0 g
A. ention.	1000 ml

Spurenelementlösung

$ZnCl_2$	40 mg
$FeCl_3 \times 6\ H_2O$	200 mg
$CuCl_2 \times 2\ H_2O$	10 mg
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	10 mg
$Na_2B_4O_7 \times 10\ H_2O$	10 mg
$(NH_4)Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	10 mg
A. ention.	1000 ml

2.2.4. Puffer

Protoplastierungspuffer		Transformationspuffer
Saccharose	103.0 g	Protoplastierungspuffer
K_2SO_4	0.25 g	mit 25 % PEG 1550
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	2.02 g	
Spurenelementlsg.	2 ml	
A. bidest.	ad 800 ml	
KH_2PO_4 (0.5 %) *	10 ml	
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$ (3.68 %)*	100 ml	
TES (0.25 M, pH 7.2)*	100 ml	

2.2.5. Konzentration der Supplemente in den Medien

Supplement	flüssige Medien	feste Medien
Ethionin	150 µg/ml	150 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml	50 µg/ml
Sulfadiazin	75/150 µg/ml	75/150 µg/ml
Tetracenomycin C	75 µg/ml	75 µg/ml
Thiostrepton	5 µg/ml	50 µg/ml

2.3. Mikroorganismen

2.3.1. Bafilomycin-Produzenten

Stamm-Nr.	Stamm	Herkunft
Tü 1907	Str. olivaceus	Komagatake, Japan
Tü 2437	Str. griseus ssp. griseus	River Kwai, Thailand
Tü 2599	Str. griseus ssp. griseus	Sillustani, Peru
Tü 2745	Str. michiganiensis ssp. xanthochromogenes	Ngorongoro, Tansania

2.3.2. Andere Makrolid-Produzenten

Stamm-Nr.	Stamm	Makrolide
FH 1532	Str. avermitilis	Avermectine
Tü 3664	Str. spec. NRRL 5739	Milbemycine
Tü 342	Str. viridochromogenes	Venturicidine

2.3.3. Plasmid-tragende Stämme

Stamm	Plasmid	Herkunft
Str. lividans 3131	pIJ 702	KATZ (1983)
Str. lividans TK 24	pHM 57	MOTAMEDI (1986b)

2.3.4. Testorganismen

2.3.4.1. Bakterien

Mikroorganismus	Medium	Temp.	Test [1])
Bacillus brevis Migula ATCC 9999	1/5	37°C	3
Bacillus cereus N.R. Smith ATCC 6464	1/5	37°C	3
Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn ATCC 6051	7/5	37°C	3
Brevibacterium flavum (Okumura) Ajinomoto ATCC 14067	7	37°C	3
Clostridium pasteurianum Winogradsky ATCC 6013	6	27°C	1
Corynebacterium glutamicum	7	27°C	3
Corynebacterium insidiosum (Mc Culloch) Jensen ATCC 10253	7	27°C	3
Micrococcus luteus (Schroeter) Cohn ATCC 381	1	27°C	3
Sarcina lutea Schroeter	1	37°C	3
Staphylococcus aureus Rosenbach Tü 202	7	37°C	3
Streptomyces glaucescens (Preobrazhenskaya) Pridham et al.Tü 49	3	27°C	3
Streptomyces violaceoruber (Waksman & Curtis) Waksman Tü 22	3	27°C	3
Streptomyces viridochromogenes Tü 57	3	37°C	3
Achromobacter geminianii Ravenel Inst. für Mikrobiol., Göttingen	1	27°C	3
Agrobacterium tumefaciens (Smith & Townsend) Cohn ATCC 15955	1	27°C	3
Erwinia carotovora DSM 30168	1	27°C	3
Erwinia atroseptica DSM 30186	1	27°C	3
Escherichia coli K12 (Migula) Castellani & Chalmers	1/5	37°C	3

Proteus mirabilis Hauser ATCC 29906	1	37°C	3
Proteus vulgaris Hauser ATCC 13315	1	37°C	3
Pseudomonas fluorescens Migula ATCC 13525	1	27°C	3
Pseudomonas syringae	8	27°C	3
Xanthomonas campestris	8	27°C	3
Xanthomonas pelargonii	8	27°C	3

2.3.4.2. Pilze

Mikroorganismus	Medium	Temp.	Test [1])
Alternaria kikuchiana Tanaka	3	27°C	4
Aspergillus fumigatus Fresenius ETH 4929, = Tü 161	3	27°C	4
Aspergillus viride-mutans CBS 127.56	3	27°C	4
Candida albicans (Robin) Berkhout Tü 565	3	37°C	3
Candida guillermondii Langeron & Guerra CBS 6021	3	27°C	3
Chaetomium globosum Kunze & Fiers Tü 138	3	27°C	3
Dipodascus magnusii Tü 167	3	27°C	3
Epidermomyes floccosus (Harz) Loeffler Tü 576	3	27°C	3
Hansenula anomala (Hansen) Sydow Tü 279	3	27°C	3
Microsporum gypseum (Bodin) Guiart & Grigorakis ATCC 42899, =Tü 282	3	27°C	3
Mucor miehei Cooney et Emerson Tü 284	3	37°C	4
Mucor racemosus DSM 62760	3	24°C	3
Nadsonia fulvescens (Nadson & Konokotina) Sydow Tü 561	3	27°C	3
Paecilomyces variotii Bainier Tü 137	3	37°C	4
Penicillium notatum Westling Tü 136	3	27°C	4
Pichia farinosa Hansen Tü 291	3	27°C	3
Rhodotorula rubra (Demme) Lodder Tü 8093	3	27°C	3
Saccharomyces cerevisiae Hansen Tü 125	3	27°C	3

Saccharomycopsis lipolytica (Wickerham et al.) Yarrow CBS 599	3	27°C	3
Schizosaccharomyces pombe Lindner Tü 501	3	27°C	3
Scopulariopsis brevicaulis Tü 8078	3	27°C	2
Trichophyton mentagrophytes (Robin) Blanchard Tü 510	3	27°C	3
Ustilago maydis (De Candolle) Corda Tü 567	3	27°C	3
Yarrowia lipolytica ATCC 8662	3	27°C	3

[1]) Die Mikroorganismen wurden wie unter 2.7.3.beschrieben getestet.

2.4. Kulturbedingungen für die Bafilomycin-Produzenten

2.4.1. Stammhaltung

Die Stämme wurden auf Schrägagarröhrchen oder Petrischalen mit Medium 3 ausgebracht, bis zur Sporulation (7 - 14 Tage) bei 27°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Zur Konservierung wurde eine Sporensuspension der Stämme bei - 20°C aufbewahrt.

2.4.2. Herstellung einer Sporensuspension

Mit den entsprechenden Stämmen beimpfte Schrägagarkolben (Medium 3) wurden 10 - 14 Tage bis zur Sporulation bei 27°C inkubiert. Anschließend wurden die Sporen mit tweenhaltiger Saline (1 Tropfen Tween 80 auf 100 ml Saline) abgeschwemmt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und 30 Min. im Ultraschallbad inkubiert, um die Sporenketten zu zerschlagen. Danach wurde die Suspension zur Abtrennung von Mycelresten

über einen Glaswattefilter abfiltriert. Die Sporen wurden abzentrifugiert (10 Min., 3000 g) und in Saline aufgenommen. Nach dem Auszählen der Sporen in der Neubauer-Zählkammer und der Lebendkeimzahl-Bestimmung wurde die Sporensuspension mit einem Titer von 1 x 10^8 Sporen/ml bei - 20°C tiefgefroren.

2.4.3. Schüttelkolbenversuche

Falls im Text nicht anders beschrieben wurden, wurden 500 ml-Erlenmeyerkolben (1 seitlicher Einstich, 100 ml Medium 11) vom Schrägagarröhrchen oder mit Sporensuspension beimpft und auf der rotierenden Schüttelmaschine (Typ RC 106, Infors AG, Basel, Schweiz; Auslenkradius 25 mm, Drehzahl 120 UpM) bei 27°C inkubiert.

2.4.4. 'resting cell'-Versuche

72 h alte Vorkulturen von Tü 2599 in 500 ml-Erlenmeyerkolben (1 seitlicher Einstich, Medium 11) wurden abzentrifugiert (10 Min., 4200 g) und 3mal mit sterilem Leitungswasser gewaschen. Das gewaschene Mycel wurde in steriler Saline aufgenommen (100 g Mycel + 200 ml Saline). 100 ml-Erlenmeyerkolben (1 seitlicher Einstich, 15 ml RC-Medium + 5 ml Supplement-Lösung in H_2O) wurden mit 5 ml der Mycelsuspension angeimpft. Die Kolben wurden bei 27°C auf der rotierenden Schüttelmaschine inkubiert, nach 48, 96 und 144 h wurde steril eine Probe entnommen und wie unter 2.5. beschrieben aufgearbeitet.

2.4.5. Fermentation

Zur Produktion der bei der Isoleucin-Verfütterung gefundenen Substanzen wurden Fermentationen im 10 l- und 25 l-Maßstab durchgeführt.

10 l-Bioreaktoren (Modell MF-14, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, USA) mit 9 l Medium 11 (+ 1,5 ml Polyol) wurden 30 Minuten bei 134°C sterilisiert. Zum Animpfen diente 1 l einer 27 - 30 h alten Vorkultur in Medium 11. Die Fermentationsparameter waren: Temperatur 27°C, Drehzahl 240 UpM, Belüftung 0,6 vvm.

25 l-Bioreaktoren (Typ b 25, Giovanola Frères S.A., Monthey, Schweiz) mit 22,5 l Medium 11 (+ 3 ml Polyol) wurden 30 Minuten bei 121°C sterilisiert. Nach dem Abkühlen wurde mit 2,5 l einer 27 - 30 h alten Vorkultur (Medium 11) angeimpft und unter folgenden Parametern fermentiert: Temperatur 27°C, Drehzahl 800 UpM, Belüftung 0,3 vvm.

2.5. Untersuchung der Fermentationsproben

2.5.1. Bestimmung des Trockengewichts

Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden zuvor abgewogene Eppendorfgefäße mit 1 ml Kulturbrühe gefüllt und 2 Min. bei 15000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, anschließend wurden die Gefäße wie bei der Bestimmung des Leergewichts über Nacht bei 100°C getrocknet und nach 1 h Äquilibrierung an Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit gewogen. Die Differenz zwischen dem Leergewicht und dem Gewicht mit Probe ergab das Myceltrockengewicht.

2.5.2. Mannitbestimmung

Der Mannitgehalt der Proben wurde durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie bestimmt. Die Bestimmung ist bei REUSCHENBACH (1986) beschrieben.

2.5.3. Bestimmung von Phenylalanin

Der Gehalt an Phenylalanin in Kulturproben wurde durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach Vorsäulen-Derivatisierung der Aminosäuren mit o-Phthalaldehyd bestimmt. Das Verfahren und die Anlage sind bei FIEDLER (1986, 1987) beschrieben. Für die Unterstützung bei der Durchführung der Analysen danke ich Herrn Dipl. Biol. A. Plaga. Zur Auftrennung der Proben wurde folgendes HPLC-System verwendet:

Säule: Analyt. Säule Länge 125 mm, I.D. 4.6 mm
Vorsäule Länge 25 mm, I.D. 4.6 mm

Säulenmaterial: Analyt. Säule Shandon ODS Hypersil 5µm
Vorsäule Shandon ODS Hypersil 5µm

Detektion: 340 nm

Gradient:

Zeit (Min.)	Mobile Phase (%) A	B
0	60	40
6.9	30	70
8.9	30	70
9.4	0	100
9.9	60	40

(A = Phosphat-Puffer, 12.5 mM, pH 7.2,
B = Methanol)

Fluß: 2 ml/Min.

2.5.4. Phosphat-Bestimmung

Die Phosphat-Bestimmung wurde wie bei REUSCHENBACH (1986) beschrieben durchgeführt. Die Methode beruht darauf, daß Phosphationen in stark saurem Milieu aus Malachitgrün-Molybdat-Chelat (orangebraun) Malachitgrün freisetzen. Die Farbintensität ist der Phosphatkonzentration direkt proportional und wird photometrisch (578 nm) gemessen.

2.5.5. Ammonium-Bestimmung

Die Bestimmung der freien NH_4^+-Ionen im Medium wurde nach der Methode von FAWCETT & SCOTT (1960) durchgeführt. In Gegenwart von Phenol-Nitroprussid und alkalischer Hypochlorid-Lösung entsteht durch Ammonium ein blauer Indophenolfarbstoff, der photometrisch (623 nm) bestimmt werden kann. Der Test wurde in Eppendorfgefäßen durchgeführt.

2.6. Bestimmung der Bafilomycine und anderer Makrolide

2.6.1. Plattendiffusionstest

Die antibiotische Aktivität der Proben wurde mit Hilfe des Plattendiffusionstests, wie bei ZÄHNER & MAAS (1972) beschrieben, bestimmt. Dazu wurden mit 15 µl Probeflüssigkeit getränkte Filterrondellen (Ø 6 mm, Macherey & Nagel, Düren) verwendet.

2.6.2. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie diente dem Nachweis der Bafilomycine und verwandter Substanzen. Fließmittel und Nachweismethoden sind von BAUMGARTNER (1985) beschrieben.

2.6.3. HPLC-Analyse der Bafilomycine

Zur Probenvorbereitung wurden 0,7 ml Kulturbrühe in einem Eppendorfgefäß mit 0,7 ml Ethanol versetzt und 20 Min. im Ultraschallbad zum Aufschluß des Mycels inkubiert. Die Probe

wurde abzentrifugiert (2 Min., 15000 g) und der Überstand wurde mit Hilfe der HPLC analysiert.

Auf Grund einer während der Durchführung dieser Arbeit erfolgten Geräteerweiterung wurden die Proben in zwei HPLC-Systemen analysiert:

a) Isokratisches System:

Geräteausstattung:	Knauer HPLC-Pumpe Knauer Spektralphotometer Knauer Autosampler Integrator Hewlett Packard 3390 A	
Säule:	Analyt. Säule Länge 125 mm, I.D. 4.6 mm Vorsäule Länge 20 mm	
Säulenmaterial:	Analyt. Säule Shandon ODS Hypersil 5µm Vorsäule Shandon ODS Hypersil 5µm	
Detektion:	254 nm	
Fließmittel:	Acetonitril	230 ml
	Methanol	215 ml
	A. bidest.	135 ml
	TBA-Chlorid	0.01 M
	Phosphat-Puffer	0.002 M, pH 7.5
Fluß:	2 ml/Min.	

b) Gradienten-System:

Geräteausstattung:	siehe isokratisches System Apple IIe-PC (mit CHROMATOCHART-Software)
Säule und Säulenmaterial:	siehe isokratisches System
Detektion:	254 nm

Gradient:

Zeit (Min.)	Mobile Phase (%) A	B
0	80	20
2	45	55
4	35	65
5	0	100
8	0	100
10	80	20

(A = Phosphat-Puffer, 0.002 M, pH 7.5,
B = Acetonitril)

Fluß: 2 ml/Min.

2.6.4. HPLC-Analyse von Avermectinen, Milbemycinen, Venturicidin A und B, Tetracenomycin C

Die Bildung von Avermectinen, Milbemycinen, Tetracenomycin C und Venturicidinen A und B wurde mit der unter 2.6.3.b) beschriebenen HPLC-Anlage und folgenden Gradienten bestimmt:

Avermectine/: Milbemycine

Zeit (Min.)	Mobile Phase (%) A	B
0	40	60
4	0	100
8.5	0	100
10	40	60

(A = Phosphat-Puffer, 0.002 M, pH 7.5,
B = Acetonitril)

Detektion bei 246 nm

Venturicidine:

Zeit (Min.)	Mobile Phase (%) A	B
0	50	50
2	0	100
8	50	50
10	50	50

(A = Phosphat-Puffer, 0.002 M, pH 7.5,
B = Acetonitril)

Detektion bei 210 nm

Das Tetracenomycin C wurde im Bafilomycin-System bei 280 nm detektiert.

2.7. Isolierung und Charakterisierung neuer Bafilomycine

2.7.1. Aufarbeitung

Die Isolierung der bei der Isoleucin-Verfütterung aufgetretenen Bafilomycine erfolgte nach dem von BAUMGARTNER (1985) ausgearbeiteten Verfahren. Die Kulturbrühe wurde nach Zugabe von 2 % Celit abfiltriert, anschließend wurde das Mycel mit Aceton aufgeschlossen und bis zum wässrigen Rückstand am Rotationsverdampfer eingeengt. Durch Adsorptionschromatographie an Amberlite XAD 2 wurde das Kulturfiltrat gereinigt, wobei die Bafilomycine mit 50 % Aceton eluiert wurden. Der eingeengte Mycelextrakt und die Aceton-Fraktion wurden dann mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Das ölige Konzentrat wurde über Adsorptionschromatographie an Kieselgel (LPPLC) mit $CHCl_3$/Aceton (3:7) als Elutionsmittel weiter aufgereinigt und auf dieser Reinigungsstufe an den Chemiker abgegeben.

2.7.2. UV-Spektren

Mit Hilfe der Photo-Dioden-Array-Detektion ist es möglich, während eines HPLC-Laufes UV-Spektren von einzelnen Peaks aufzunehmen. Der Aufbau der Anlage ist bei FIEDLER (1984) beschrieben. Als HPLC-System wurde das unter 2.6.3. beschriebene Gradientensystem benutzt.

2.7.3. Vergleichendes Wirkungsspektrum

Die Aktivität chemisch und biologisch variierter Bafilomycine gegen die unter 2.3.4. beschriebenen Testorganismen wurde im Plattendiffusionstest verglichen. Die Füllung der Petrischalen betrug 10 ml.

1) Die Anfertigung von Testplatten mit Clostridium pasteurianum ist bei SANTO (1976) beschrieben.
2) Der Test an der Riesenkolonie (Scopulariopsis) wurde nach HÜTTER et al. (1965) durchgeführt.
3) Alle anderen Mikroorganismen wurden als Übernachtkultur angezogen. Die Kultur wurde auf eine $OD_{578\ nm}$ von 1 eingestellt und 1 ml der Vorkultur zu 200 ml Agar pipettiert.
4) Von Schrägagarröhrchen mit Sporenbildnern wurden die Sporen mit 5 ml steriler, wässriger Natriumlaurylsulfat-Lösung (100 mg/ml) abgeschwemmt und zum Gießen von 200 ml Agar verwendet.

Zur Ermittlung des MHK-Wertes im Plattendiffusionstest wurden verschiedene Substanzkonzentrationen (15 µl/Rondelle) getestet. Als minimale Hemmkonzentration ist die durch Extrapolation ermittelte Konzentration angegeben, bei der gerade kein Hemmhof mehr zu sehen war.

2.7.4. Nematoden-Test

Der Test mit dem Nematoden Caenorhabditis elegans A2 wurde nach der bei REUSCHENBACH (1986) beschriebenen Methode durchgeführt.

Der Titer der Nematoden in den Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen) betrug etwa 50 Würmer pro Napf. Die Endkonzentration der Bafilomycine wurde auf 50, 25, 10 und 5 µg/ml eingestellt. Es wurden 3 parallele Ansätze getestet. Während

der Inkubation bei 18°C wurde nach 48 und 120 h die Vitalität der Nematoden im Lichtmikroskop überprüft. Für die Durchführung des Tests danke ich Frau I. Rindfleisch.

2.7.5. Hemmung der Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere

Der Test auf Hemmung der Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere ist bei BAUMGARTNER (1985) beschrieben. Zur Messung des bei der Reaktion entstandenen Phosphats wurde die unter 2.5.4. aufgeführte Bestimmungsmethode angewendet.

2.8. Protoplastierung

2.8.1. Protoplastierung und Regeneration

Die Stämme wurden nach der von THOMPSON (1982) beschriebenen Methode protoplastiert. Dazu wurden Vorkulturen in Kolben mit eingelegter Metallspirale (Ø 1 mm, Windung 20 mm) kultiviert. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet und 10 Min. bei 2000 g abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 10.3 % Saccharose wurde das Pellet in P-Puffer mit Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) aufgenommen und bis zur vollständigen Protoplastierung (60 - 90 Min.) unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Suspension wurde mit einer 5 ml-Pipette mehrmals auf- und abgesogen und weitere 15 Min. inkubiert. Unprotoplastierte Bestandteile wurden anschließend über einen sterilen Glaswattefilter abfiltriert. Nach einmaligem Abzentrifugieren (10 Min., 2000 g) wurden die Protoplasten in P-Puffer aufgenommen.

Zur Beurteilung der Protoplastierung dienten folgende Kriterien: 1) Protoplastentiter: Dazu wurden die Protoplasten in

der Bakterien-Zählkammer ausgezählt. 2) Protoplastierungsgrad, Regenerationsrate: Zur Bestimmung des Protoplastierungsgrades und der Regenerationsrate wurden Verdünnungsreihen in A. ention. + SDS (0.05 %) und in P-Puffer angefertigt und auf Regenerationsmedium (Medium 14) ausplattiert.

Der Protoplastierungsgrad wird angegeben als:

$$P = (n_P - n_{SDS})/n_P \times 100\ (\%)$$

n_P = Anzahl der in P-Puffer verdünnten Zellen

n_{SDS} = Anzahl der in A. ention. + SDS verdünnten Zellen)

Die Regenerationsrate wird angegeben als:

$$R = (n_P - n_{SDS})/n_Z \times 100\ (\%)$$

n_Z = Anzahl der ausgezählten Protoplasten

Die Protoplasten wurden bei - 70°C in P-Puffer aufbewahrt.

2.8.2. Protoplastenfusion

0,1 ml von Protoplastensuspensionen mit annähernd gleicher Trübung wurden in einem Eppendorfgefäß vereinigt und 2 Min. bei 1100 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Protoplastierungspuffer aufgenommen, durch Aufziehen mit einer Eppendorf-Pipette gut durchmischt und wiederum abzentrifugiert. Nach Zugabe von 0,8 ml 50 % PEG (0,4 g PEG 1550 + 0,4 ml Protoplastierungspuffer) wurde die Suspension 2 Minuten bei Raumtemperatur zur Fusion belassen. Die Suspension wurde anschließend 10^{-1}- und 10^{-2}-fach verdünnt. 0,1 ml der Ausgangssuspension und der Verdünnungen wurden mit 2 ml 0,4 %iger Agarose auf zuvor 2 Tage bei 37°C inkubierte Platten mit Medium 14 ausgebracht. Die Regenerationsplatten wurden 20 Min. unter einem Laminar Flow Cabinet (ASW-UP 1200, Bleymehl, Jülich) getrocknet und anschließend bei 30°C bis zur Sporulation inkubiert. Die Sporen wurden wie unter 2.4.2. beschrieben geerntet und zur Charakterisierung der Genotypen auf Selektionsmedien ausgebracht.

2.9. Plasmidisolierung

Die in der Arbeit verwendeten Plasmide wurden durch alkalische Lyse (KIESER, 1984) isoliert. Die Methode ist ausführlich bei HOPWOOD (1985) beschrieben. Für eine Minilyse wurden ca. 200 mg Mycel (Naßgewicht) eingesetzt, für einen Großansatz die 10fache Menge. Auf die bei HOPWOOD beschriebene zweite Phenol/Chloroform-Extraktion und die Behandlung mit Spermidin/HCl wurde verzichtet.

2.9.1. Quantitative Bestimmung der DNA

Die isolierte DNA-Menge wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die DNA-Menge wurde nach folgender Formel errechnet: $OD_{260\ nm} \times 50 = c_{DNA}$ (μg/ml) (HOPWOOD, 1985).

2.9.2. Restriktionsverdau

Die isolierte Plasmid-DNA wurde zur näheren Charakterisierung mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen nach dem bei HOPWOOD (1985) beschriebenen Ansatz verdaut. Für die Endonucleasen wurde MS-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 6 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl) verwendet.

2.9.3. Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophoresen wurden mit Flachbettelektrophoresegeräten (Modell H4 und H6, Bethesda Research Laboratories Inc., Rockville, USA) durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE-Puffer (0,04 M Tris-Acetat, 0,002 M EDTA, pH 8,0) verwendet. Zur Anfärbung der DNA wurde, wenn nicht anders angegeben, in die noch flüssige Agarose Ethidiumbromid

(0,5 µg/ml) gegeben. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer (12 % Saccharose, 20 mM EDTA, pH 8,0, 0,05 % Bromphenolblau) versetzt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA mit einem UV Transilluminator (Ultraviolet Products, San Gabriel, USA) sichtbar gemacht und mit einer Polaroid MP-4 Land Kamera durch einen Rotfilter bei Blende 8,0 photographiert. Der Polaroid Positiv Negativ Land Film (Typ 665) wurde 1 Min. belichtet und nach Beschreibung des Herstellers weiterbehandelt.

2.10. Transformation

Die Transformation wurde nach der von HOPWOOD (1985) beschriebenen Methode bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Protoplasten wurden, wie unter 2.8.2. beschrieben, in 2 ml 0.4 %igen Weichagar eingebettet, auf Regenerationsmedium ausgebracht. Die Regenerationsplatten (Medium 14) wurden nach 16 - 18 h mit 2.5 ml thiostreptonhaltigem (500 µg/ml) Medium 16 zur Selektion der Transformanten überschichtet.

Die Transformationsrate wird angegeben als:

$$T = n_T/n_R$$

n_T = Anzahl der Transformanten/Transformation

n_R = Anzahl der regenerierten Protopl./Transformation

Zum Nachweis der Bildung Bafilomycin- oder Tetracenomycin C-verwandter Substanzen, wurden jeweils ca. 300 Kolonien in Mikrotiterplatten auf ihre antifungische Aktivität getestet. Außerdem wurden jeweils 50 Kolonien in Medium 11 angezogen, und nach 48 und 120 h wurden Kulturproben mittels HPLC auf die Produktion von Bafilomycinen oder Tetracenomycin C hin untersucht.

2.11. Mutagenese

Die im Verlauf der Arbeit isolierten Mutanten wurden durch verschiedene Mutagenese-Techniken erzeugt. Die Methoden sind bei HOPWOOD (1985) beschrieben und gehen auf die Verfahren von DELIC et al. (1970, NTG-Mutagenese) und DRAKE & BALTZ (1976, EMS-Mutagenese) zurück.

2.11.1. Isolierung von auxotrophen Mutanten

Auxotrophe Mutanten wurden nach der Methode von HOLLIDAY (1956) und HOPWOOD (1970) charakterisiert.

2.11.2. Isolierung von Bafilomycin-Nichtproduzenten

Zur Isolierung von Nichtproduzenten wurden Kolonien des 0.1 - 1 %-Überlebenswertes der Absterbekurve der Mutagenese auf Mikrotiterplatten ausgebracht und 96 - 120 h bei 27°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit Mucor miehei Tü 284 in Medium 3 überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Kolonien, bei denen keine Wachstumshemmung des Testkeims festzustellen war, wurden in Flüssigkultur auf Bafilomycin-Produktion getestet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Nachweis der Bafilomycine

Die Bafilomycine konnten im biologischen Test, durch Dünnschichtchromatographie und durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie nachgewiesen werden (WERNER, 1981; BAUMGARTNER, 1985; DEEG, 1986). Im HPLC-Routinebetrieb wurden die Bafilomycine isokratisch und im Gradienten-System erfaßt. Dabei konnte auf die Zugabe eines Ionenpaars (Tetrabutylammoniumchlorid) zur Auftrennung des Bafilomycins C_1 verzichtet werden. Das System hatte zudem den Vorteil, durch die Veränderung der Elutionskraft des Fließmittels komplexe biologische Probengemische rascher und besser aufzutrennen (MEYER, 1979). Die Abbildung 3 zeigt die Auftrennung einer Fermentationsprobe (Medium 11, 120 h) und eines Bafilomycin-Standards.

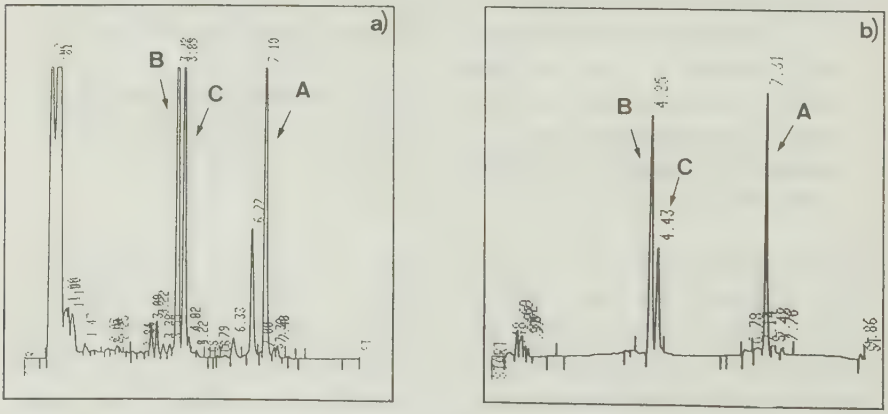


Abb. 3: HPLC-Analysen im Gradienten-System: a) Fermentationsprobe, b) Bafilomycin-Standard (0.1 mM)

Zur quantitativen Bestimmung der Bafilomycine wurden die in Abbildung 4 dargestellten Eichkurven für die Bafilomycine A_1, B_1 und C_1 benutzt. Sie zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Peakfläche und der Bafilomycin-Konzentration im gemessenen Konzentrationsbereich. Außerhalb des Meßbereichs liegende Konzentrationen wurden entsprechend verdünnt.

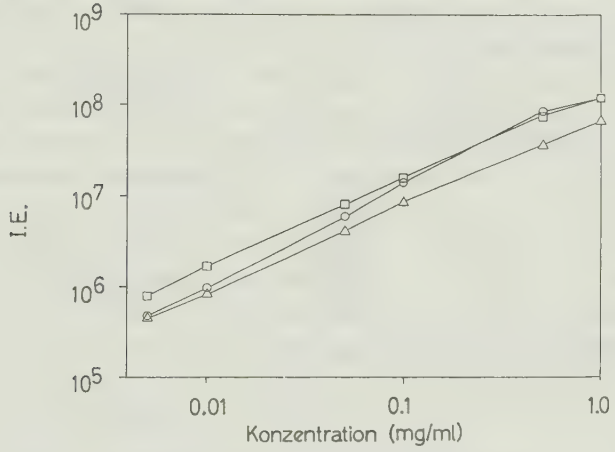


Abb. 4: Eichkurve zur quantitativen Bestimmung der Bafilomycine

□ Baf. A_1 ○ Baf. B_1 △ Baf. C_1

3.2. Isolierung und Charakterisierung von Mutanten

Mutanten von Streptomyces griseus Tü 2599 wurden durch EMS- und NTG-Mutagenese gewonnen. Zur Isolierung einer möglichst großen Zahl von Einfachmutanten wurden Kolonien des 0.1 - 1 %-Überlebensratezeitpunktes aus der Absterbekurve

(HOPWOOD, 1970) zur weiteren Bearbeitung gewählt (EMS-Mutagenese 30 bis 50 Min., NTG-Mutagenese 20 bis 30 Min.). In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit benutzten Mutanten von Streptomyces griseus Tü 2599 zusammengefasst.

Tab. 2: Mutanten von Streptomyces griseus Tü 2599

Mutante	Mutation	Mutagenese	Bafilomycin-Spektrum
1. Auxotrophe Mutanten			
1-149	val^-, ile^-	NTG	A_1, B_1, C_1
2. Nicht- oder Weniger-Produzenten			
1-65		NTG	wenig A_1, B_1, C_1
1-167		NTG	B_1
1-179		NTG	A_1, B_1, C_1
1-215		NTG	-
1-242		NTG	-
1-298		NTG	wenig A_1, B_1, C_1
1-364		NTG	-
3. Antibiotika-resistente Mutanten			
2-0	Str^r	-	A_1, B_1, C_1
2-65			wenig A_1, B_1, C_1
2-167			B_1
2-179			wenig
2-364			-
3-0	Tcm^r	-	A_1, B_1, C_1
3-65			wenig A_1, B_1, C_1
3-167			B_1
3-179			wenig A_1, B_1, C_1
3-215			-
3-242			-
3-298			wenig A_1, B_1, C_1
3-1 bis 3-52	Sulfadiazin^r	EMS	A_1, B_1, C_1
4-1 bis 4-20	Ethionin^r	NTG	A_1, B_1, C_1

Die Antibiotika-resistenten Mutanten waren Spontanmutanten, die mit einer Wahrscheinlichkeit von $< 10^{-7}$ beim Ausplattie-

ren einer Sporensuspension auf Medium 3 mit dem entsprechenden Antibiotikum auftraten. Durch EMS- oder NTG-Mutagenese konnte der Anteil der Antibiotika-resistenten Kolonien nicht erhöht werden.

Bei der Suche nach Nichtproduzenten wurden unter 1000 getesteten Kolonien drei echte Nichtproduzenten gefunden: Tü 2599-1-215, Tü 2599-1-242 und Tü 2599-1-364. Diese Mutanten bildeten in Medium 11 keine antifungische Aktivität, auch konnten mittels DC oder HPLC keine Bafilomycine detektiert werden. Die Mutanten Tü 2599-65, -167, -179 und -298 zeigten schwache antifungische Aktivität, sie bildeten geringe Mengen der angegebenen Bafilomycine. 5 Mutanten konnten durch Komplementationsversuche in 4 Komplementationsgruppen eingeordnet werden: I (215, 242) ---> II (167) ---> III (179) ---> IV (65). Die Mutanten Tü 2599-1-215 und 1-242 wurden von 1-167, 1-179 und 1-65 komplementiert, Tü 2599-1-167 von 1-179 und 1-65 und Tü 2599-1-179 nur von 1-65. Diese Mutanten wurden zur Transformation und zur Protoplastenfusion eingesetzt.

3.3. Versuche zur Biomodifikation der Bafilomycine

Für Versuche zur biologischen Modifikation der Bafilomycine bot sich die 'resting cell'-Technik an, die zur Untersuchung der Biosynthese von Antibiotika und deren Regulation entwikkelt wurde (DEMAIN & KENNEL, 1978). Durch die Trennung der Produktionsphase von der Wachstumsphase und die Möglichkeit, in chemisch definierten Medien mit variabler Zelldichte die Antibiotika-Produktion zu untersuchen, schien sie auch geeignet, durch gerichtete Fermentation, Blockieren einzelner Biosyntheseschritte oder Mutasynthese nach modifizierten Bafilomycinen zu suchen.

3.3.1. 'resting cell'-System

Als Ausgangspunkt für die Optimierung eines RC-Systems für Streptomyces griseus Tü 2599 diente das von KURTH (1981) für den Nikkomycin-Produzenten Streptomyces tendae beschriebene RC-Medium mit Mannit und Asparagin als C- bzw. N-Quelle. Da die Bafilomycine zwischen pH 6 und pH 8,5 gebildet wurden (BAUMGARTNER, 1985, BLANK, 1984), wurde das RC-Medium mit TES-Puffer (50 mM) auf pH 7.5 eingestellt. Asparagin wurde durch Ammoniumsulfat als N-Quelle ersetzt und die Spurenelemente als Stammlösung zugesetzt. Die beste Bafilomycin-Produktion wurde im RC-System mit 72 h alten Vorkulturen erzielt.

In Abbildung 5 ist der Fermentationsverlauf im optimierten RC-System dargestellt. Die Bafilomycin-Produktion setzte mit dem Überimpfen der Kultur in das chemisch definierte Medium ein. Streptomyces griseus produzierte im RC-System als Hauptkomponenten die Bafilomycine A_1 und B_1, nur in geringem Maße Bafilomycin C_1. Die durchschnittliche Produktionsrate lag bei 2.2 mg Bafilomycine/l/h, die spezifische Produktionsrate betrug 0.3 mg Bafilomycine/g TG/h. Die C-Quelle Mannit war nach 144 h zu 75 % verbraucht. Während der Phosphatgehalt zurückging, nahm die Konzentration an freien NH_4^+-Ionen von 0.007 mM auf 0.06 mM leicht zu. Die Zunahme des Trockengewichts zeigte ein leichtes Wachstum der Kultur an.

3.3.2. Gerichtete Fermentation

3.3.2.1. Verfütterung von verzweigtkettigen Aminosäuren

Erste Versuche zur biologischen Modifikation der Bafilomycine in komplexem Produktionsmedium hatten ergeben, daß sich die Bafilomycin-Produktion zwar durch Verfütterung von verzweigt-

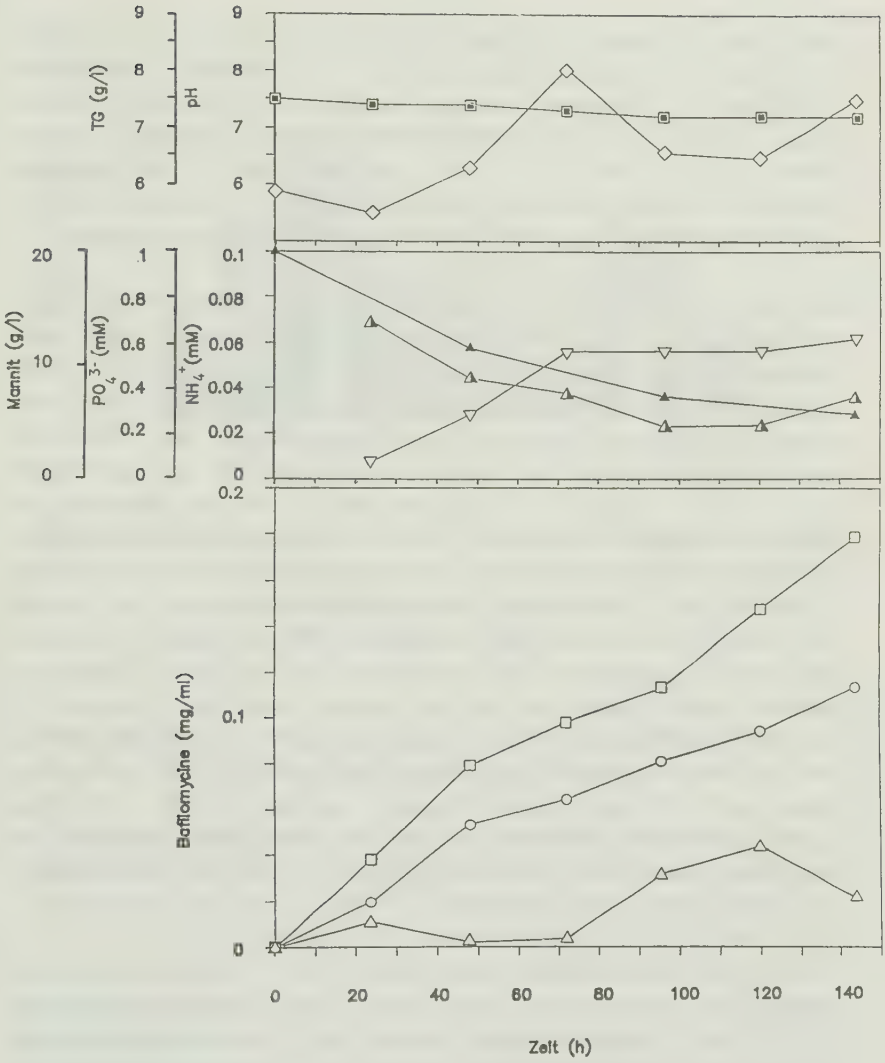


Abb. 5: Fermentationsverlauf von Str. griseus im 'resting cell'-System

Baf. A_1 — Baf. B_1 — Baf. C_1 — TG — PO_4^{3-} — NH_4^+ — Mannit — pH

kettigen Aminosäuren (10 mM) bis um den Faktor 1.7 steigern ließ, daß aber außer den Bafilomycinen A_1, B_1 und C_1 sowie Bafilomycin D (Tubaymycin) keine anderen Verbindungen nachgewiesen werden konnten (BAUMGARTNER, 1985). Um höhere Supplementkonzentrationen (10 - 100 mM) zu testen und störende Effekte auf das Wachstum auszuschließen, wurde der Einfluß der verzweigtkettigen Aminosäuren im RC-System untersucht.

Die Abbildung 6 zeigt den Einfluß von verschiedenen Konzentrationen an Valin, Leucin oder Isoleucin auf die Bafilomycin-Produktion. Die Verfütterung von Valin führte wie im komplexen Medium zu einer deutlichen Steigerung der Bafilomycin-Produktion, um bis zu 250 % bei Zugabe von 50 mM. Dabei war die Stimulation von C_1 (Faktor 8) im Vergleich zu A_1 (Faktor 3.7) und B_1 (Faktor 1.6) am stärksten. Leucin förderte in Konzentrationen von 10 und 50 mM die Bafilomycin-Produktion. Besonders stimuliert wurde, wie bei Valin, die Bafilomycin C_1-Produktion (Faktor 13), Bafilomycin A_1 wurde um den Faktor 1.5 mehr gebildet, dagegen etwas weniger Bafilomycin B_1 (Faktor 0.8). Die Zugabe von Isoleucin zeigte keinen stimulierenden Effekt, wenn man die gebildeten Mengen Bafilomycin A_1, B_1 und C_1 betrachtete. Allerdings traten bei Verfütterung von 50 und 100 mM Isoleucin im HPLC-Spektrum drei neue Substanz-Peaks auf. Folgende Beobachtungen sprachen dafür, daß diese drei neuen Peaks Bafilomycin-analoge Verbindungen darstellten, bei denen die Isopropylgruppe am C_{23} durch eine Methylpropylgruppe ersetzt war:

- Die Retentionszeiten der Peaks 1, 2 und 3 waren im isokratischen HPLC-System im Vergleich zu den Bafilomycinen A_1, B_1 und C_1 um denselben Faktor (1.3) in den lipophileren Elutionsbereich verschoben (Abb. 7a). Durch eine zusätzliche Methylgruppe am C_{25} müßten die Bafilomycine A_1, B_1 und C_1 gleichmäßig lipophiler werden.

- Die durch Photodiodenarray-Detektion aufgenommenen UV-Spektren (Abb. 7a, b) der neuen Peaks stimmten mit den UV-Spek-

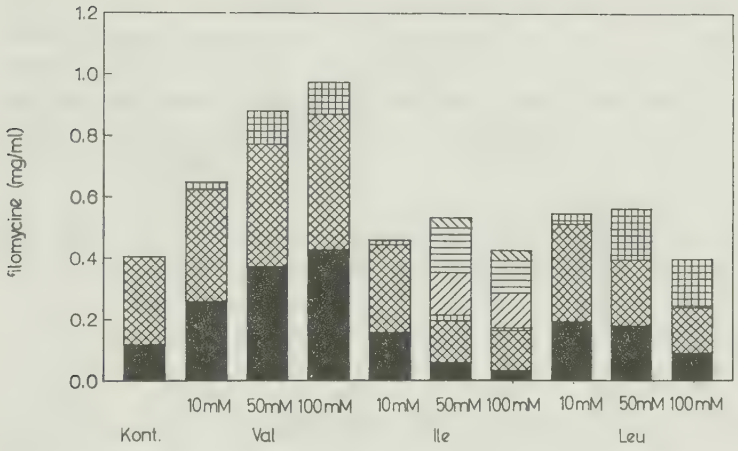


Abb. 6: Bafilomycin-Produktion von Str. griseus im RC-System bei Verfütterung von Valin, Isoleucin und Leucin im Vergleich zur Kontrolle

Baf. A_1 Baf. B_1 Baf. C_1
Baf. 1 Baf. 2 Baf. 3

tren der Bafilomycine A_1, B_1 und C_1 überein. Sie zeigten die für die Bafilomycine typischen Maxima bei 246 nm und 280 nm.

- Die gebildete Menge an Bafilomycinen A_1, B_1 und C_1 war im Vergleich zur Kontrolle um die Menge der neuen Substanzen vermindert. Addierte man die Konzentrationen der Peaks 1, 2 und 3 zu der Menge an Bafilomycin A_1, B_1 und C_1, wurde auch bei Verfütterung von Isoleucin eine leichte Stimulation der Bafilomycin-Produktion sichtbar. Dabei war die durchschnittliche Produktionsrate für die Peaks 1, 2 und 3 (0.6 mg/l/h) etwa halb so hoch wie die Bafilomycin A_1, B_1, C_1-Produktionsrate (1.3 mg/l/h).

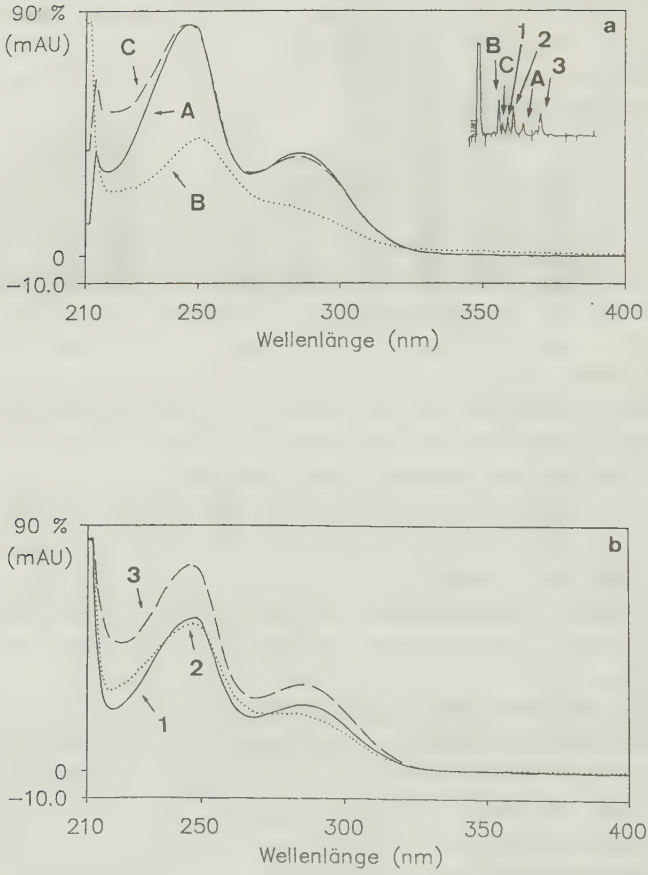


Abb. 7: HPLC-Analyse (isokratisch) und UV-Spektren der Bafilomycine A_1, B_1 und C_1 (a) sowie der bei Verfütterung von Isoleucin neu aufgetretenen Peaks (b).

Die Produktion dieser neuen Substanzen konnte auch beobachtet werden, wenn Isoleucin in komplexem Medium (11) verfüttert wurde. Tabelle 3 zeigt, daß die beste Produktion erzielt werden konnte, wenn Isoleucin in hoher Konzentration (100 mM) schon zu Beginn der Fermentation vorlag.

Tab. 3: Einfluß der Isoleucin-Konzentration und des Verfütterungszeitpunktes auf die Produktion an 'analogen' Bafilomycinen
(Baf.: Bafilomycine A_1, B_1, C_1; Baf.': Bafilomycine 1, 2, 3)

Isoleucin (mM)	Zeitpunkt (h)	Baf. (mg/ml)	Baf.' (mg/ml)
-		0.76	-
50	0	0.47	0.08
	24	0.83	0.04
	48	0.45	0.02
100	0	0.40	0.20
	24	0.64	0.13
	48	0.38	0.06

Zur Bereitstellung von Material für die Strukturaufklärung wurde Streptomyces griseus im 25 l-Bioreaktor in mit Isoleucin supplementiertem Medium 11 angezogen. Der Bioreaktor wurde nach 168 h geerntet und wie unter 2.7.1. beschrieben aufgearbeitet.

Für den zum Bafilomycin A_1 analogen Peak wurde die in Abbildung 8 aufgeführte Struktur (KELLER-SCHIERLEIN, 1986) ermittelt. Im Unterschied zum Bafilomycin A_1 ist die Propylgruppe am C-Atom 23 durch eine Methylpropylgruppe ersetzt. Die Strukturen der zu Bafilomycin B_1 und C_1 analogen Peaks konnten im Verlauf der Arbeit nicht ermittelt werden. Die biolo-

gische Wirksamkeit des Bafilomycins A_{Ile} ist unter 3.4. beschrieben.

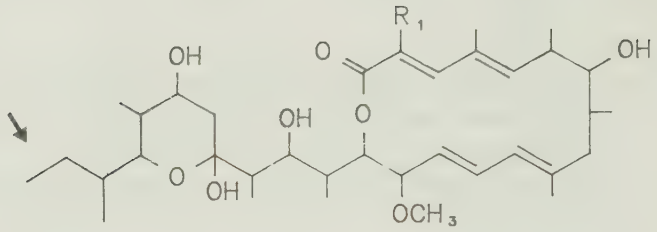


Abb. 8: Struktur des bei Verfütterung von L-Isoleucin neu aufgetretenen Bafilomycins A_{Ile} (KELLER-SCHIERLEIN, 1986).

3.3.2.2. Verfütterung von α-Ketosäuren

Die verzweigtkettigen Aminosäuren werden über α-Ketosäuren in Acyl-Co A-Einheiten umgewandelt, die als Starter von Polyketiden dienen können (LEHNINGER, 1975). Deshalb wurde eine Reihe von α-Ketosäuren (Phenylglyoxylsäure (PGS), Furylglyoxylsäure, Cyclopropylglyoxylsäureamid (CGA), α-Oxononansäureamid (ONA), α-Ketotridecansäureamid) auf ihren Einfluß auf die Bafilomycin-Produktion getestet. PGS, CGA und ONA führten in Konzentrationen über 50 mM zur Verschiebung des Produktionsspektrums. Dabei induzierten PGS und CGA (50 mM) je einen gegenüber Bafilomycin B_1 hydrophileren Substanz-Peak mit Retentionszeiten von 2.9 Min. bzw. 2.6 Min. (B_1 4 Min.). Die gebildete Menge lag bei ca. 0.1 mg/l bzw. 0.025 mg/l. Bei der Verfütterung von ONA (50 mM) trat bei einer Retentionszeit von 5.3 Min. im Gradientensystem ein neuer Substanzpeak auf, der in einer Menge von 0,004 mg/l gebildet wurde. Die

Aufnahme der UV-Spektren (Abb. 9) im Photodioden-Array-Gerät ergab für die durch CGA induzierte Substanz Maxima bei 250 bzw. 280 nm, für die bei PGS- und ONA-Verfütterung beobachteten Verbindungen Maxima bei 245 bz. 280 nm. Dies läßt eine Verwandtschaft zu den Bafilomycinen vermuten. Eine weitere Charakterisierung war auf Grund der geringen gebildeten Substanzmengen nicht möglich.

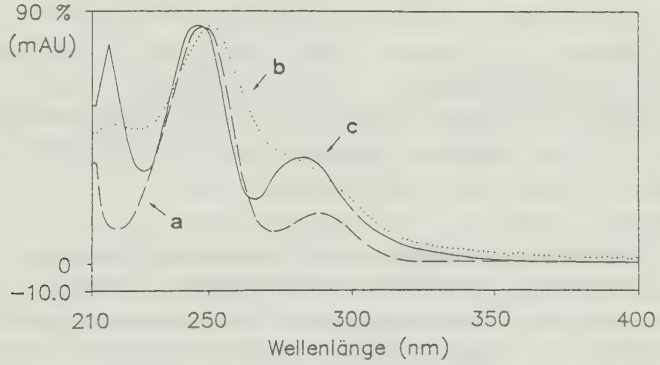


Abb. 9: UV-Spektren der bei Verfütterung von -Ketosäuren (50 mM) aufgetretenen neuen Substanzen
a: Verfütterung von Phenylglyoxylsäure,
b: Verfütterung von Cyclopropylglyoxylsäureamid,
c: Verfütterung von α-Oxononansäureamid.

3.3.2.3. Verfütterung aromatischer Vorstufen

Durch die Isoleucin-Verfütterung konnte gezeigt werden, daß eine Variation des Startermoleküls der Bafilomycine möglich war. Um zu testen, ob auch aromatische Verbindungen in das Bafilomycin-Molekül eingeführt werden können, wurden folgende Verbindungen Str. griseus im RC-System angeboten:

1) In Konzentrationen von 0,1 bis 100 mM verfütterte Substanzen aus der Zimtsäure-Gruppe (Zimtsäure, Zimtsäureethylester,

Kaffeesäure, Ferulasäure) wurden von Streptomyces griseus nicht in die Bafilomycine eingebaut. Niedere Konzentrationen (0,1 und 1 mM) stimulierten die Bafilomycin-Produktion schwach (Faktor 1.2 bzw 1.35), Konzentrationen über 10 mM führten zu einem Rückgang der Produktion von Bafilomycin A_1 und B_1 (Faktor < 0.67 bzw < 0.21), während die Produktion von Bafilomycin C_1 stimuliert (> Faktor 5) wurde.

2) Verbindungen aus dem Shikimisäure-Stoffwechsel (p-Aminobenzoesäure, Shikimisäure, Anthranilsäure, p-Aminoacetophenon, 4-Methylacetophenon, Brom-Acetophenon) führten wie die Verbindungen aus der Zimtsäure-Familie in hohen Konzentrationen (> 10 mM) zu einem starken Produktionsrückgang. Neue Substanzen konnten nicht detektiert werden.

3) Cycloalkancarbonsäuren (Cyclopentancarbonsäure, Cyclohexancarbonsäure, Cycloheptancarbonsäure, 1-Methyl-1-cyclohexansäure, trans-4-(Aminomethyl)-cyclohexancarbonsäure, trans-Cyclohexan-1,4-dicarbonsäure) waren angeboten worden, weil sie bei thermophilen Bacillus-Arten in Fettsäuren eingebaut werden (KRISCHKE, 1986). Sie führten in Konzentrationen ab 10 mM zu einer Hemmung der Bafilomycin-Produktion. Die HPLC-Analyse ergab kein verändertes Produktionsspektrum.

4) Aromatische Aminosäuren und verwandte Verbindungen (Phenylalanin, Phenylpyruvat, Phenylacetat, Phenylglycin, Tyrosin, p-Hydroxyphenylpyruvat):

Den Einfluß der Verfütterung von Verbindungen aus der Familie der aromatischen Aminosäuren zeigt die Abbildung 10. Phenylalanin und Phenylpyruvat stimulierten die Bafilomycin-Produktion stark, während Phenylacetat und Phenylglycin zu einem deutlichen Produktionsrückgang führten. Tyrosin und p-Hydroxyphenylpyruvat zeigten keine Wirkung.

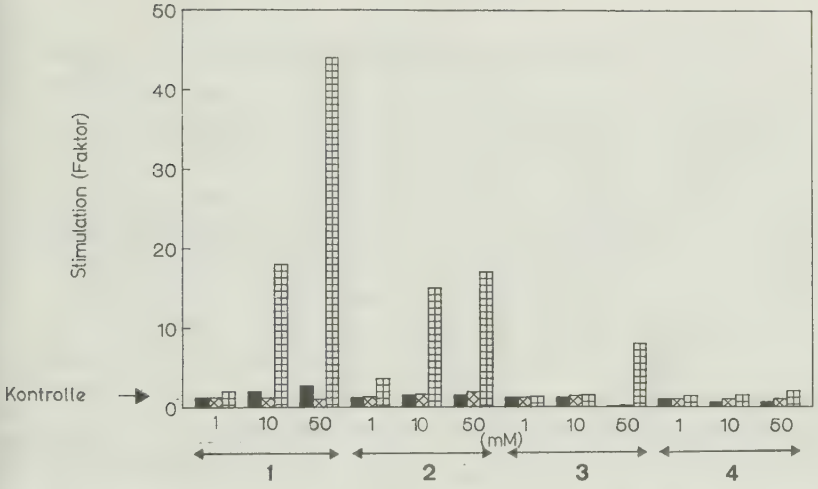


Abb. 10: Einfluß der Verfütterung von aromatischen Aminosäuren und verwandten Verbindungen auf die Bafilomycin-Produktion von Str. griseus (96 h-Wert)
1: Phenylalanin, 2: Phenylpyruvat, 3: Phenylacetat, 4: Phenylglycin ■ Baf. A_1 ⊠ Baf. B_1 ▦ Baf. C_1

In Abbildung 11 ist der Produktionsverlauf im RC-System bei Verfütterung von Phenylalanin (50 mM) dargestellt. Str. griseus zeigte nach 96 h eine höhere spezifische Gesamtproduktion (1.6 mg/g TG/h) als ohne Zugabe von Phenylalanin. Während das Phenylalanin nach 144 h vollständig verstoffwechselt war, wurde das Mannit nur zu 50 % verwertet. Die Ammoniumbestimmung ergab, daß der Gehalt an NH_4^+ nach 48 h auf über 2 mM anstieg. Der leichte Anstieg des Trockengewichts bei Zugabe von Phenylalanin erklärte teilweise die verbesserte Produktion, die durchschnittliche und die spezifische Produktionsrate lagen jedoch auch nach 144 h mit 8.2 mg/l/h bzw. 0.9 mg/g TG/h deutlich über der Kontrollfermentation.

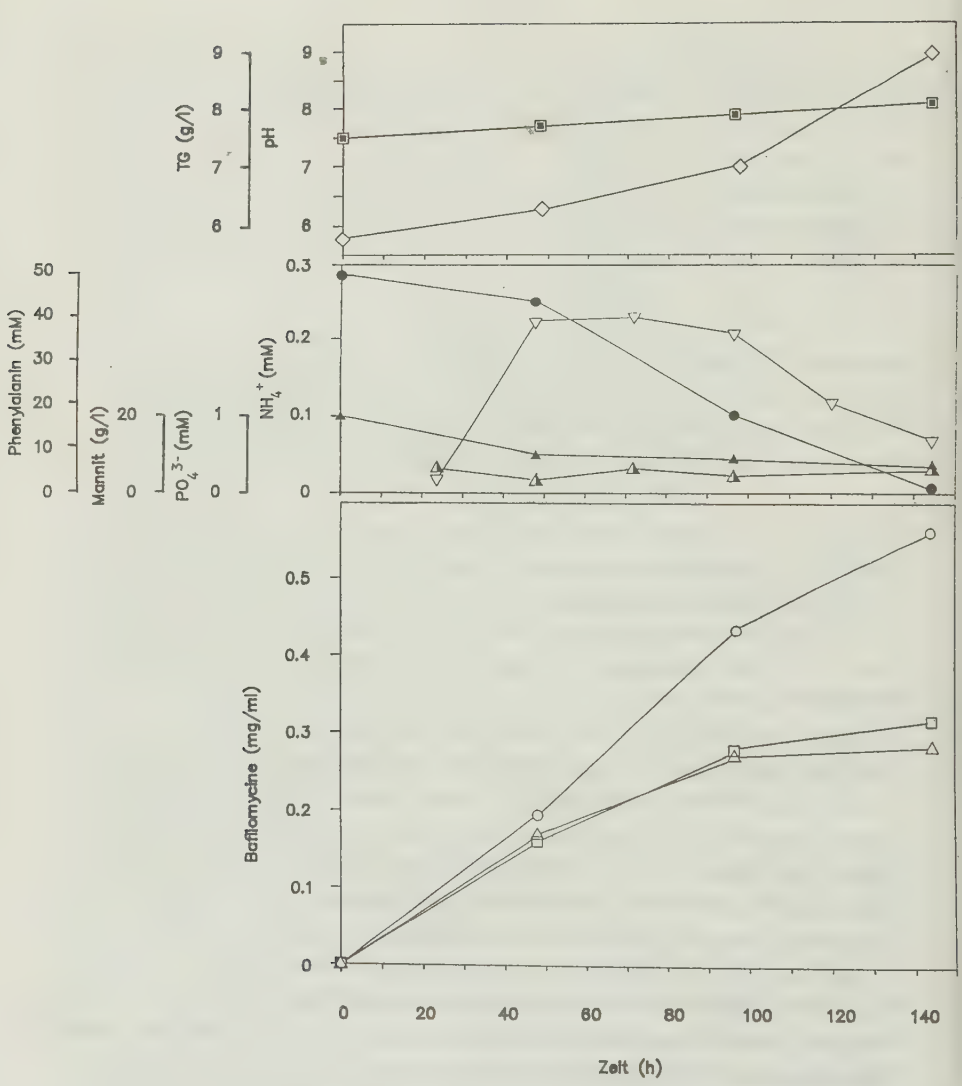


Abb. 11: Bafilomycin-Produktion im 'resting cell'-System bei Verfütterung von 50 mM L-Phenylalanin

Baf. A_1 — Baf. B_1 — Baf. C_1 — Phe
TG — PO_4^{3-} — NH_4^+ — Mannit — pH

3.3.2.4. Verfütterung von Phosphoglyceriden

In diesem Versuch sollte getestet werden, ob die Bafilomycin-Produktion durch Zugabe von Phosphoglyceriden stimuliert werden kann. Bei der Verfütterung von Fettsäuren und Ölen in komplexen Medien waren bei Str. griseus und Str. olivaceus (BAUMGARTNER, 1985, BLANK, 1984) Produktionssteigerungen erzielt worden. Das Ergebnis des Versuchs zeigt die Abbildung 12. Sojalecithin und Phosphatidylcholin steigerten die Bafilomycin-Produktion schon in einer Konzentration von 0.08 %. Die beste Produktion wurde bei einer Konzentration von 8 % erreicht. Besonders stimuliert wurde die Produktion an Bafilomycin B_1 und C_1.

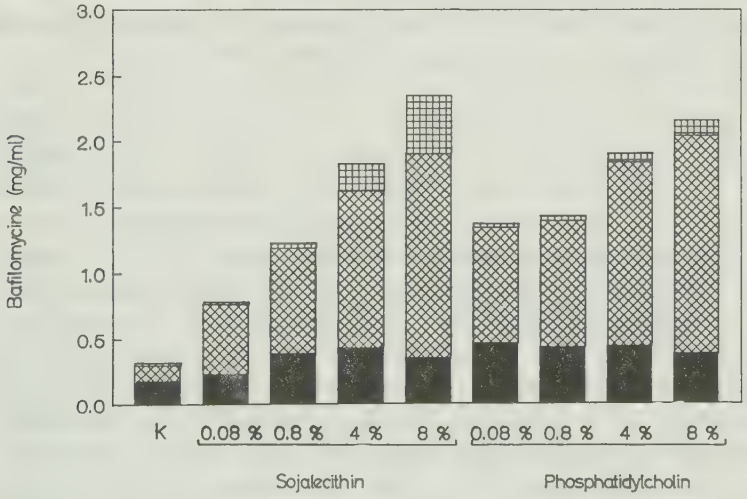


Abb. 12: Einfluß von Phosphoglyceriden auf die Bafilomycin-Produktion von Streptomyces griseus im 'resting cell'-System

Baf. A_1 Baf. B_1 Baf. C_1

3.3.2.5. Kombination von Verfütterungseffekten

Ein Problem bei den Verfütterungsversuchen war die geringe Bildungsrate der modifizierten Substanzen. Dies führte zu Nachweisproblemen und zu Schwierigkeiten, größere Substanzmengen für die Strukturaufklärung zu gewinnen. Mit den verzweigtkettigen Aminosäuren, den aromatischen Aminosäuren und Phosphoglyceriden waren gute Effektoren der Bafilomycin-Biosynthese gefunden worden. Es bot sich deshalb an, stimulierende und variierende Substanzen kombiniert zu verfüttern, um auf diesem Wege zu höheren Ausbeuten an modifizierten Substanzen zu gelangen. Die Kombination der Verfütterungseffekte wurde an drei Beispielen untersucht:

- Zunächst wurde getestet, ob sich der produktionssteigernde Effekt durch Phenylalanin und Phosphatidylcholin mit der Biomodifikation durch Isoleucin kombinieren ließ.

Tab. 4: Modifikation und Stimulation der Bafilomycin-Produktion von Str. griseus im 'resting cell'-System bei Verfütterung von Isoleucin, Phenylalanin und Phosphatidylcholin
Baf.: Bafilomycine A_1, B_1, C_1; Baf.': Modifizierte Bafilomycine 1, 2, 3

Ile (mM)	Suppl.	Produktionsrate (mg/l/h) Baf.	Baf.+ Baf.'	Verh. (%) Baf./Baf.'
50	-	1.8	2.8	35
50	Phe, 50 mM	4.4	8.2	46
100	-	1.5	2.6	33
100	Phe, 50 mM	1.7	2.8	42
100	Sojal., 8 %	1.3	2.0	33
100	Phe, 50 mM + Sojal., 8 %	1.1	1.8	42

Wie die Tabelle 4 zeigt, ließen sich die verschiedenen Effekte zum Teil kombinieren. Die Phenylalanin-Zugabe bei der geringeren Isoleucin-Konzentration (50 mM) bewirkte eine deutliche Stimulation. Dagegen war bei Verfütterung hoher Konzentrationen Isoleucin (100 mM) und Phenylalanin (50 mM) keine Produktionssteigerung (110 %) zu beobachten. Der Anteil an analogen, neuen Bafilomycinen stieg bei der kombinierten Verfütterung auf über 40 % im Vergleich zu 33 % bei der Isoleucin-Verfütterung. Sojalecithin zeigte in den getesteten Kombinationen keine stimulierende Wirkung.

- Der produktionssteigernde Effekt von Phenylalanin und Phosphoglyceriden ließ sich auch auf die Bildung der durch Supplementation mit Cyclopropylglyoxylsäureamid und -Oxononansäureamid induzierten Substanzen übertragen. Diese Substanzen wurden in nur sehr geringer Konzentration gebildet. Durch Zugabe von Phenylalanin (50 mM) wurde die durchschnittliche Produktionsrate der induzierten Substanzen bei Verfütterung von CGA um den Faktor 1.8, bei ONA um den Faktor 4.5 erhöht.

- An der durch Phenylglyoxylsäure induzierten Substanz wurde untersucht, ob durch eine kombinierte Verfütterung von Valin und Phenylglyoxylsäure eine Stimulation zu erreichen war. Aus der Tabelle 5 ist ersichtlich, daß Valin in geringer Konzentration (10 mM) die Bildung des durch PGS induzierten Peaks stimulierte. Die durchschnittliche Produktionsrate war ohne Zugabe von Valin mit 0.7 mg Bafilomycine/l/h im Vergleich zur Kontrolle PGS (2.2 mg/l/h) stark vermindert und wurde durch die Zugabe von Valin auf 1.7 mg/l/h gesteigert. Die durchschnittliche Produktionsrate des neuen Peaks nahm ab einer Valin-Konzentration über 10 mM ab.

Tab. 5: Verfütterung von Valin (10, 50, 100 mM) und Phenylglyoxylsäure an Str. griseus im 'resting cell'-System
(Baf. ges.: Bafilomycine A_1, B_1, C_1; X: Durch Phenylglyoxylsäure induzierter Peak)

	Produktionsrate (mg/l/h)			
Valin-Konz. (mM)	0	10	50	100
Baf. ges.	0.70	1.74	1.71	1.86
X	0.13	0.19	0.14	0.09

3.3.2.6. Übertragbarkeit der Ergebnisse

Die Effekte der gerichteten Fermentation im RC-System konnten bedingt miteinander kombiniert werden. So stellte sich die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Bafilomycin-Produzenten oder auf andere Makrolid-Produzenten.

Die Bafilomycin-Produzenten Streptomyces olivaceus Tü 1907, Streptomyces griseus Tü 2437 und Streptomyces michiganiensis Tü 2745 wurden in mit Isoleucin (100 mM) supplementiertem Medium 11 kultiviert, um den Einfluß der Verfütterung auf die Bafilomycin-Bildung zu testen. Das Ergebnis der Verfütterung zeigt Tabelle 6. Die Verfütterung von Isoleucin in hoher Konzentration (100 mM) induzierte auch bei Tü 2437 und Tü 2745 die Bildung analoger Bafilomycine. Bei Tü 1907, der die Bafilomycin-Glykoside Leucanicidin und Bafilomycin-A_1-21-O-(α-L-rhamnopyranosid) bildete, wurden ebenfalls zwei in den lipophilen HPLC-Bereich verschobene Peaks beobachtet, die gebildete Menge reichte aber zur Quantifizierung nicht aus.

Tab. 6: Verfütterung von Isoleucin (100 mM) in Medium 11 an Str. griseus Tü 2437 und Str. michiganiensis Tü 2745
Baf.: Bafilomycine A_1, B_1, C_1; Baf.': Modifizierte Bafilomycine 1, 2, 3

Stamm	Baf. (mg/ml)			Baf.' (mg/ml)		
	A_1	B_1	C_1	A_1'	B_1'	C_1'
Tü 2437	0.15	0.18	0.06	0.12	0.04	0.03
Tü 2745	0.10	0.25	0.05	0.11	0.31	0.58

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Streptomyceten wurde an zwei Stämmen, die den Bafilomycinen entfernt verwandte Makrolide bildeten, untersucht: Str. viridochromogenes Tü 342 produziert die mit dem Irumamycin (OMURA et al., 1982b) verwandten Venturicidine (BRUFANI et al., 1972), Str. spec. NRRL 5739 die zur Avermectin-Familie gehörenden Milbemycine (MISHIMA et al. 1975, 1983).

- Der Test auf eine mögliche Verbesserung der Venturicidin-Produktion durch Phenylalanin und Phenylpyruvat wurde in komplexem Nährmedium (11) durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der Venturicidin-Konzentration erfolgte mittels Plattendiffusionstest (Botrytis cinerea) und HPLC. Tabelle 7 zeigt das Ergebnis der Verfütterung. Der Versuch ergab, daß auch die Venturicidin-Produktion durch Zugabe aromatischer Verbindungen erhöht werden kann. Die Steigerung war bei Verfütterung von Phenylpyruvat stärker als bei Phenylalanin.

- Str. spec. NRRL 5739 zeigte in Medium 11 nur eine sehr geringe Milbemycin-Produktion (0.004 mg/ml). Durch die Verfütterung der Effektoren (Phenylalanin, Phosphoglyceride) ließ sich die Milbemycin-Bildung bis um den Faktor 3 stimulieren (Tab. 8). Wie auch bei der Untersuchung der Bafilomycin-Pro-

duktion erbrachte die kombinierte Verfütterung der Phosphoglyceride und des Phenylalanins keine Produktionsverbesserung.

Tab. 7: Effekt der Verfütterung von Phenylalanin und Phenylpyruvat auf die Venturicidin-Produktion durch Str. viridochromogenes Tü 342
(Medium 11 ohne Supplement = 100 %)

Supplement	Venturicidin-Produktion (in %) 1 mM	10 mM	50 mM	100 mM
Phenylalanin	96	111	114	125
Phenylpyruvat	93	110	164	104

Tab. 8: Milbemycin-Produktion von Str. spec. NRRL 5739 bei Verfütterung von Phenylalanin und Phosphoglyceriden (Sojal.: Sojalecithin, Phosph.: Phosphatidylcholin)

Supplement	Konz.	Milbemycine (mg/ml)	% Kontrolle
Kontrolle		0.004	100
Phenylalanin	50 mM	0.005	117
	100 mM	0.008	205
Sojal.	4 %	0.009	225
	8 %	0.006	145
Phosph.	4 %	0.013	321
	8 %	0.010	241
Phe	50 mM	0.003	83
+ Sojal.	4 %		
Phe	50 mM	0.004	98
+ Phosph.	4 %		

3.3.3. Blockierung der Methylierung

Die Bafilomycine werden an den C-Atomen 2 und 14 nachträglich methyliert. Bei ersten Versuchen, in komplexem Medium durch Zugabe von Ethionin oder Sulfonamiden die Methylierung zu verhindern, bildete Str. griseus keine modifizierten Bafilomycine (BAUMGARTNER, 1985).

Da der Stamm gegen Ethionin und Sulfonamide sensitiv war, wurde ein Eingriff in die Methylierungsreaktion auf folgenden Wegen versucht:

- Aus einer NTG-Mutagenese konnten 15 gegen eine Ethionin-Konzentration von 300 mg/l resistente Mutanten isoliert werden. Die Anzucht der Mutanten in Medium 11 mit Ethionin (200 mg/l) ergab, daß bei 3 Mutanten die Bafilomycin-Produktion unterdrückt war, und dafür im hydrophilen HPLC-Bereich zwei in geringer Menge gebildete, neue Substanzpeaks (Abb. 13) mit einer Retentionszeit von 1.8 bzw. 2.2 Min. auftraten. Die UV-Spektren der Substanzen sind in Abbildung 13 dargestellt. Das Spektrum der Verbindung I zeigte Maxima bei 250 und 320 und 340 nm. Die Maxima der Verbindung II lagen bei 260 nm und bei 325 nm.

- Um den Einfluß verschiedener Sulfonamide auf die Bafilomycin-Produktion zu testen, wurden Sulfaguanidin, Sulfapyridin, Sulfadiazin in unterschiedlicher Konzentration (0,1, 1 und 5 mg/ml) im RC-System verfüttert. Dabei traten keine wesentlichen Änderungen im von Str. griseus gebildeten Substanzspektrum auf. Die Gesamtproduktion an Bafilomycinen war gegenüber der Kontrolle gleich, bei Zugabe von 5 mg/ml etwas geringer, zudem war das gebildete Bafilomycin-Spektrum zum Bafilomycin C_1 hin verschoben.

- Bei einer EMS-Mutagenese konnten 25 Sulfadiazin-resistente (150 mg/l) Mutanten isoliert werden. Kultivierte man diese

Mutanten in mit Sulfadiazin (75 bzw. 150 mg/l) supplementiertem Medium 11, produzierten 23 bei einer Sulfadiazin-Konzentration von 75 mg/l die Bafilomycine A_1, B_1 und C_1. Zwei der Mutanten bildeten kein Bafilomycin A_1, B_1 oder C_1, dafür die schon bei der Ethionin-Verfütterung beobachteten hydrophilen Verbindungen I und II mit einer Retentionszeit von 1.8 bzw. 2.2 Min. (Abb. 13). Bei einer Sulfadiazin-Konzentration von 150 mg/l war die Bafilomycin-Produktion bei 12 der Mutanten deutlich gehemmt. Bei dieser Konzentration konnten bei allen Mutanten zwei hydrophile Substanzen detektiert werden.

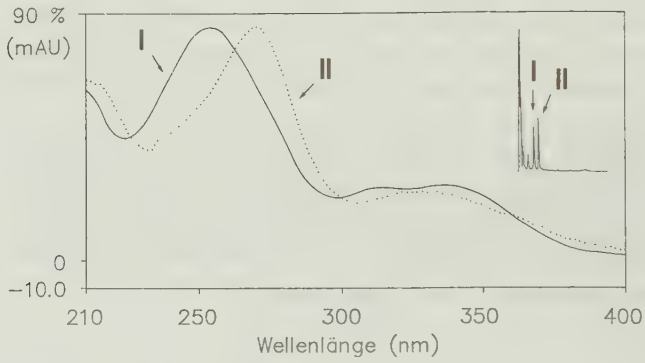


Abb. 13: HPLC-Analyse und UV-Spektren zweier hydrophiler Substanzen, die bei Anzucht von Ethionin-resistenten bzw. Sulfadiazin-resistenten Mutanten in mit Ethionin bzw. Sulfadiazin supplementiertem Medium 11 auftraten.

Die Strukturen der Verbindungen konnten im Verlauf der Arbeit nicht ermittelt werden. Die UV-Spektren der aus der Ethionin-Verfütterung isolierten Verbindungen zeigten bei der hydrophileren Verbindung I eine Übereinstimmung des Maximums bei ca. 250 nm mit dem Bafilomycin-UV-Spektrum. Die Auftrennung

einer aufkonzentrierten Probe mittels DC (Laufmittel Ethylacetat/MeOH/H_2O 20/4/3) ergab eine UV-aktive Substanz mit R_f-Wert 0, die sich durch Ansprühen mit HCl/MeOH (Bafilomycin-Nachweis) nicht anfärben ließ. Beide hydrophile Verbindungen wurden bemerkenswerterweise auch von den Nichtproduzenten Tü 2599-1-215 und -1-242 in Medium 11 (ohne Ethionin- oder Sulfadiazin-Verfütterung) gebildet.

3.3.4. Versuche zur Produktion von Hybrid-Antibiotika

Die Bildung von Hybrid-Antibiotika sollte durch Rekombination der Bafilomycin-Stämme mit anderen Polyketid-Produzenten erreicht werden. Dazu wurden zwei Ansätze unternommen:
1) Streptomyces griseus wurde mit dem von MOTAMEDI (1986a, b) konstruierten Plasmid pHM 57, das die Biosynthesegene für die Polyketidkette des Tetracenomycins C enthielt, transformiert. Die Transformanten wurden auf die Produktion von Tetracenomycin- oder Bafilomycin-verwandten Substanzen hin untersucht.
2) Nach Fusion von Protoplasten des Bafilomycin-Produzenten Streptomyces griseus Tü 2599 mit Protoplasten des Avermectin-Produzenten Streptomyces avermitilis FH 1532 sollten Fusionten gesucht werden, die modifizierte Bafilomycine oder Avermectine bildeten.

Voraussetzung für beide Ansätze war ein zufriedenstellendes Protoplastierungs- und Regenerationssystem. Deshalb wurde zunächst die Übertragbarkeit der in der Literatur beschriebenen Protoplastierungsmethoden auf die Stämme getestet.

3.3.4.1. Protoplastierung der Makrolid-Produzenten

Zur Protoplastierung von Str. griseus Tü 2599 konnte die von THOMPSON (1982) beschriebene Protoplastierungsmethode übernommen werden. Eingesetzt wurden Kulturen aus der spät logarithmischen Wachstumsphase, die Streptomyces griseus in Me-

dium 13 nach 44 h erreichte. Da sich ein homogenes Wachstum der Kulturen als Voraussetzung für eine gute Protoplastierung erwies, wurden zur Anzucht Kolben mit eingelegter Spirale verwendet. Die Protoplastierung konnte durch die Zugabe von Glycin zum Anzuchtmedium verbessert werden. In Tabelle 9 ist ein Vergleich der Protoplastierung bei unterschiedlichen Glycinkonzentrationen im Anzuchtmedium dargestellt.

Tab. 9: Protoplastierung und Regeneration von Streptomyces griseus bei Anzucht in Medium 13 (44 h) mit unterschiedlicher Glycinkonzentration

Glycin (in %)	Wachstum (mikroskopisch beurteilt)	P (in %)	R (in %)
0	fein, kaum Pellets	73	2
0.1	"	88.4	30
0.5	kleine Pellets (Abb. xa))	> 99	15
1.0	kompakte, dichte Pellets	< 10	-

Am homogensten wuchs Str. griseus in Medium 13 ohne Glycin an, bei steigender Glycin-Konzentration bildete der Stamm kompaktere, dichtere Pellets. Bei Glycin-Konzentrationen zwischen 0.1 und 0.5 % wurde die beste Protoplastierung erreicht. Die Regenerationsrate lag bei einer Glycin-Konzentration von 0.1 % bei 30 %, der Anteil der nicht protoplastierten Einheiten war mit ca. 12 % sehr hoch. Bei 0.5 % Glycin war die Regenerationsrate (15 %) etwas schlechter, der Anteil der nicht protoplastierten Zellen dagegen gering (< 1 %). Auf die Regeneration der Protoplasten hatte die Feuchtigkeit der Regenerationsplatten und die Art des Ausbringens der Protoplasten einen großen Einfluß. Das Trocknen der Regenerationsplatten und das Einbetten der Protoplasten in Agarose verbesserte die Regeneration um den Faktor 2 bis 5. Die Protoplasten regenerierten unter diesen Bedingungen rasch.

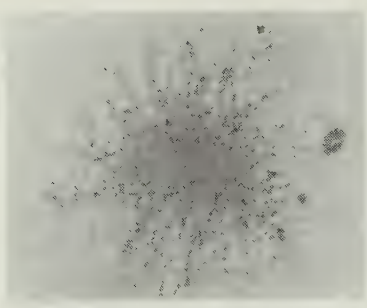
Nach ca. 3 Tagen waren deutliche Kolonien auf den Platten zu erkennen, die sich morphologisch nicht vom Ausgangsstamm unterschieden.

Bei dem Versuch, die Protoplastierungsbedingungen auf die Mutanten zu übertragen, ergaben sich teilweise deutliche Unterschiede in den Regenerationsraten. Dies zeigt ein Überblick über die mit dem Wildstamm und den Mutanten erzielten Ergebnisse (Tab. 10).

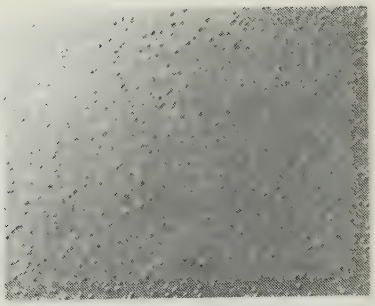
Tab. 10: Protoplastierung von Str. griseus (Wildstamm und Mutanten) bei Anzucht in Medium 13 (44 h, 0.5 % Glycin)

Stamm	Wachstum	P (in %)	R (in %)
Tü 2599		> 99	15
Tü 2599-215		> 99	8
Tü 2599-242		> 99	0.3
Tü 2599-364		> 99	19
Tü 2599-3-0 (Tcm^r)		> 99	10
Tü 2599-3-167 (Tcm^r)		> 99	10
Tü 2599-3-179 (Tcm^r)		> 99	2
Tü 2599-3-215 (Tcm^r)		> 99	3
Tü 2599-3-242 (Tcm^r)		> 99	0.5

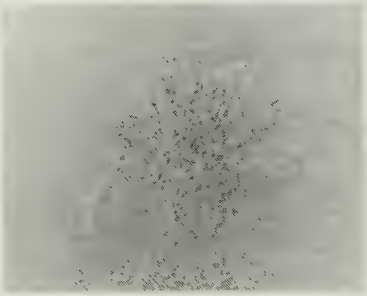
Die Protoplastierung setzte bei Wildstamm und Mutanten kurz nach der Zugabe des Lysozyms ein und erfolgte innerhalb von 60 Minuten. Bei Tü 2599-3-179 waren jedoch erst nach 45 bis 50 Minuten erste Protoplasten zu beobachten. Trotz mikroskopisch scheinbar gleicher Vorkultur war der Stamm nach 90 Minuten nur schlecht protoplastiert. Die Abbildung 14 zeigt zum Vergleich Vorkulturen und Protoplasten von Tü 2599-3-0, -3-167 und -3-179.



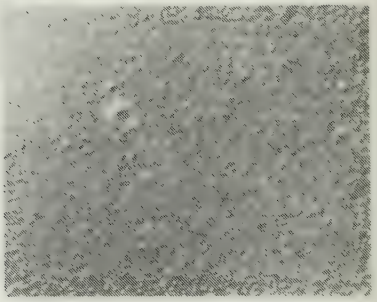
a



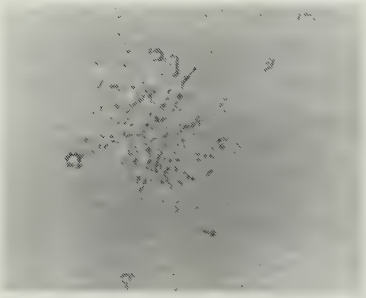
b



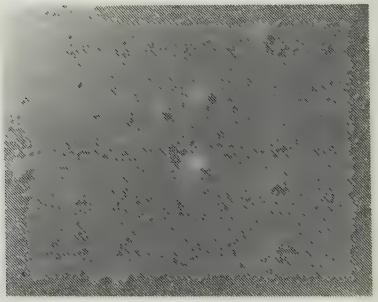
c



d



e



f

Abb. 14: Protoplastierung von Str. griseus und Mutanten
a: Tü 2599-3-0 Vorkultur b: abfiltriiert, 90 Min.
c: Tü 2599-3-167 Vorkultur d: abfiltriert, 90 Min.
e: Tü 2599-3-179 Vorkultur f: abfiltriert, 90 Min.

Die Protoplastierungsbedingungen ließen sich nicht auf Streptomyces avermitilis FH 1532 übertragen. Obwohl sich der Stamm nach Anzucht in Medium 13 gut protoplastieren ließ, gelang es nicht, die Protoplasten erfolgreich zu regenerieren. Erst Versuche mit einem anderen Vorkulturmedium führten zu einer guten Regeneration des Avermectin-Produzenten. Die Tabelle 11 zeigt Protoplastierungs- und Regenerationsrate für FH 1532 bei Anzucht des Stammes in Medium 13 oder 15 mit verschiedenen Glycin-Konzentrationen.

Tab. 11: Protoplastierung und Regeneration von Streptomyces avermitilis FH 1532 bei Anzucht in Medium 13 oder 15

Medium	Glycin (in %)	P (in %)	R (in %)
13, 72 h	0.1	< 10	0.0002
96 h	0.1	< 10	0
	0.5	< 10	0.002
15, 96 h	0	> 99	9.5
	0.1	> 99	3
	0.5	> 99	5
	1.0	> 99	0.8

3.3.4.2. Transformation von Str. griseus

Die Plasmide pIJ 702 und pHM 57 wurden aus Streptomyces lividans 3131 bzw. TK 24 isoliert. Die Abbildung 15 zeigt einen Verdau der isolierten Plasmide mit verschiedenen Restriktionsenzymen.

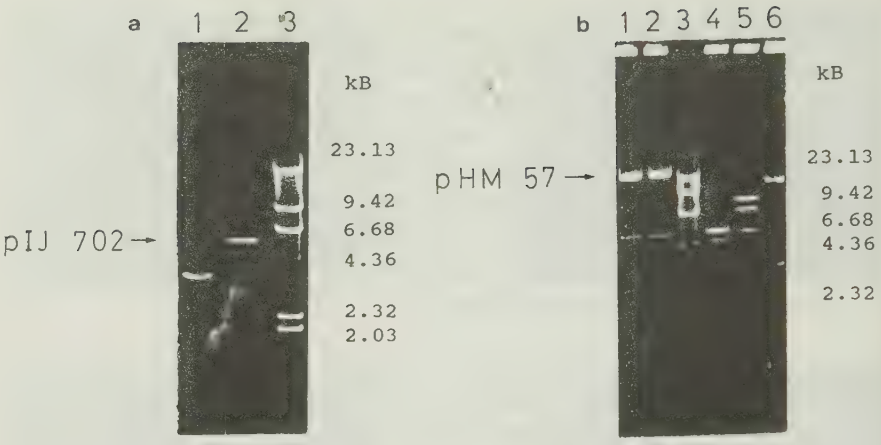


Abb. 15: Verdau der aus Streptomyces lividans 3131/2 bzw. aus Streptomyces lividans TK 24 isolierten Plasmide pIJ 702 (a) bzw. pHM 57 (b)
(a) pIJ 702: 1: unverd. 2: Bam HI 3: Hind III
(b) pHM 57: 1: Cla I 2: Eco RV 3: Hind III
4: Pvu II 5: Bam HI 6: unverd.

Das von HOPWOOD (1985) beschriebene Transformationssystem konnte auf Streptomyces griseus Tü 2599 übertragen werden. Die Transformanten wurden durch die auf beiden Plasmiden kodierte Thiostrepton-Resistenz selektioniert. Anhand des 2. Markers, der Tyrosinase, konnten mit pIJ 702 oder pHM 57 transformierte Kolonien unterschieden werden. Die pIJ 702-Transformanten zeigten im Gegensatz zu pHM 57-Transformanten auf Medium 10 einen schwarzen Hof um die Kolonien. Mit den isolierten Plasmiden konnten beim Wildstamm mit ca. 3 µg Plasmid/Ansatz Transformationsraten zwischen 10^{-5} und 10^{-7} erzielt werden, pro µg DNA wurden mit pIJ 702 10^2 bis 10^3, mit pHM 57 um 10^2 Transformanten erreicht.

Die Transformationrate war abhängig davon, bei welcher Glycinkonzentration die Stämme zur Protoplastierung kultiviert

worden waren. Protoplasten aus Vorkulturen ohne oder mit 0.5 % Glycin ließen sich am besten transformieren (Tab. 12).

Tab. 12: Abhängigkeit der Transformation von der Protoplastierung des Rezipienten

Plasmid	Transformationsrate bei Glycin-Konz.		
	0 %	0.1 %	0.5 %
pIJ 702	9.8×10^{-6}	8.9×10^{-7}	1.2×10^{-5}
pHM 57	2.7×10^{-6}	1.9×10^{-7}	1.3×10^{-6}

Für alle weiteren Versuche wurden Protoplasten eingesetzt, die aus einer mit 0.5 % Glycin supplementierten Vorkultur erhalten worden waren. Die Transformationrate war auch abhängig von der eingesetzten Plasmidmenge, wie Tabelle 13 zeigt. Deshalb wurden die Transformationen mit Plasmidmengen über 5 µg/Ansatz durchgeführt.

Tab. 13: Abhängigkeit der Transformation von der eingesetzten DNA-Menge

Plasmid	Eingesetzte Menge/10^9 Protoplasten		
	1.5 µg	3 µg	7.5 µg
pIJ 702	6.6×10^{-6}	1.2×10^{-5}	2.1×10^{-5}
pHM 57	1.4×10^{-6}	1.5×10^{-6}	7×10^{-6}

Um zu untersuchen, ob durch die Transformation von Streptomyces griseus mit pHM 57 die Bildung von Hybrid-Antibiotika möglich war, wurden außer dem Ausgangsstamm Str. griseus Bafilomycin-Nichtproduzenten eingesetzt. Da das auf pHM 57 kodierte Tetracenomycin C eine sehr gute Wirksamkeit gegen

Streptomyceten aufweist, mußten zunächst Tetracenomycin-resistente Stämme gesucht werden (vgl. 3.2.).

Die Transformationsbedingungen waren im wesentlichen auf alle Stämme übertragbar. Die Tabelle 14 gibt wieder, welche Transformationsraten erzielt werden konnten.

Tab. 14: Transformation von Streptomyces griseus und Mutanten mit pHM 57
(Akt.: Aktivität gegen Mucor miehei Tü 284)

Stamm	T	Akt.	HPLC (Tcm)
Tü 2599	7×10^{-6}	+	-
Tü 2599-215	3.6×10^{-7}	-	-
Tü 2599-242	1×10^{-8}	-	-
Tü 2599-364	5.3×10^{-7}	-	-
Tü 2599-3-0 (Tcm^r)	1×10^{-5}	+	-
Tü 2599-3-167 (Tcm^r)	1×10^{-6}	(+)	-
Tü 2599-3-179 (Tcm^r)	1×10^{-6}	(+)	-
Tü 2599-3-215 (Tcm^r)	1.6×10^{-6}	-	-
Tü 2599-3-242 (Tcm^r)	4.2×10^{-7}	-	-

Bei der Anzucht der Transformanten konnten außer den teilweise gebildeten Bafilomycinen A_1, B_1 oder C_1 keine weiteren antifungischen Substanzen isoliert werden. Auch die Analyse der Proben mittels HPLC gab keinen Hinweis auf die Bildung Tetracenomycin-verwandter Verbindungen. Es fiel allerdings auf, daß bei der Transformation der Tetracenomycin-resistenten Stämme um etwa den Faktor 10 höhere Transformationsraten erzielt werden konnten.

Bei allen Stämmen wurde versucht, die Plasmide durch eine Minilyse aus den Transformanten zu isolieren und damit zu belegen, daß die Transformation erfolgreich war. Außerdem

sollte die DNA zur weiteren Transformation eingesetzt werden. Es konnte allerdings in keinem der Transformanten pIJ 702 oder pHM 57 nachgewiesen werden.

3.3.4.3. Protoplastenfusion

Für die Versuche zur Protoplastenfusion nach der von HOPWOOD (1985) beschriebenen Methode wurden Antibiotika-resistente Mutanten von Str. griseus und der Wildstamm Str. avermitilis FH 1532 eingesetzt. Zur Selektion wurden die Antibiotika-Resistenzen der Bafilomycin-Stämme und die starke Melanin-Bildung von Str. avermitilis ausgenutzt. Str. griseus ist melanin-negativ. Die durchgeführten interspezifischen Fusionen sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tab. 15: Interspezifische Fusionen von FH 1532 mit Tü 2599

Fusion	Selektion auf	Rekomb.rate
FH 1532 x Tü 2599-2-0 Str^r	mel, Str	-
FH 1532 x Tü 2599-2-65 Str^r	mel, Str	-
FH 1532 x Tü 2599-2-179 Str^r	mel, Str	-
FH 1532 x Tü 2599-2-364 Str^r	mel, Str	-
FH 1532 x Tü 2599-3-0 Tcm^r	mel, Tcm	-
FH 1532 x Tü 2599-3-167 Tcm^r	mel, Tcm	-

Die Regenerationsplatten waren nach 4 Tagen dicht mit Str. griseus bewachsen. Str. avermitilis-Kolonien waren nur bei den 100fach verdünnten Fusionen an der Melaninbildung zu erkennen. Bei der anschließenden Selektion konnten weder Str. avermitilis- noch rekombinante Kolonien gefunden werden.

Um zu testen, ob sich die Fusionsbedingungen auf eine intraspezifische Fusion von Str. griseus übertragen ließen, wurden die Antibiotika-resistenten Mutanten untereinander

fusioniert. Die Selektion erfolgte auf die Antibiotika-Resistenz. Das Ergebnis der Fusionen zeigt die Tabelle 16.

Tab. 16: Intraspezifische Fusion von Str. griseus

Fusion	Selektion auf	Rekomb.rate
Tü 2599-2-0 x Tü 2599-3-0	Str, Tcm	5×10^{-5}
Tü 2599-2-65 x Tü 2599-3-0	Str, Tcm	2.2×10^{-5}
Tü 2599-2-65 x Tü 2599-3-167	Str, Tcm	-
Tü 2599-2-179 x Tü 2599-3-0	Str, Tcm	1×10^{-4}
Tü 2599-2-179 x Tü 2599-3-167	Str, Tcm	-
Tü 2599-2-364 x Tü 2599-3-0	Str, Tcm	3.3×10^{-3}
Tü 2599-2-364 x Tü 2599-3-167	Str, Tcm	5×10^{-5}

Bei den Fusionen konnten rekombinante Kolonien gefunden werden. Dabei lag die Rekombinationsrate zwischen 10^{-3} und 10^{-5}. Antibiotika-sensitive Mutanten der Ausgangsstämme traten mit einer Wahrscheinlichkeit $< 10^{-7}$ auf. Bei Fusionen mit dem Nichtproduzenten -3-167 wurde keine Rekombination festgestellt.

3.4. Wirkung von Bafilomycin-Derivaten

Die Bafilomycine A_1, B_1, C_1 (Abb. 1a, S. 2), D (Abb. 1b, S. 3), A_{Ile} (Abb. 8, S. 40), G (Abb. 18, S. 71), die Bafilomycin-Glycoside (Abb. 1a, S. 2) sowie die chemisch derivatisierten Bafilomycine P, V_2, W_1, X_1 und X_2 (Abb. 19, S. 84) wurden antibakteriell, antifungisch, auf ihre Wirkung gegen Caenorhabditis elegans und auf ihre Wirkung als Na^+K^+-ATPase-Inhibitoren getestet. Zusätzlich getestet wurden die Flavensomycinsäure, die den C_{21}-Substituenten des Bafilomycins B_1 darstellt, und Virustomycin A.

3.4.1. Wirkungsspektrum

In der Tabelle 17 (S. 64) sind die Ergebnisse des antifungischen Wirkspektrums dargestellt. Bafilomycin B_1 war am besten antifungisch wirksam. Dann folgten Bafilomycin C_1 und die Bafilomycin-Glykoside (L_1, L_2). Die Bafilomycine A_1, A_{Ile}, D, G, P und Virustomycin waren schwach aktiv, Die chemischen Derivate zeigten keine antifungische Wirkung. Zusammengefaßt ergab sich folgende Reihenfolge in der Aktivität der Verbindungen:

	Bafilomycine	MHK-Werte (µg/ml)
Abnehmende Aktivität ↓	B_1	0.1 - 50
	C_1, L_1, L_2, X_1, X_2	50 - 200
	A_1, A_{Ile}, D, P, G, Virustomycin A	> 100
	V_2, W_1	> 2200

Tab. 17: Antifungische Wirkung (MHK-Werte in µg/ml) von nativen und chemisch modifizierten Bafilomycinen

Mikroorganismus	Bafilomycine			
	A_1	B_1	C_1	D
Mucor miehei	58	4.6	5.1	140
Mucor racemosus	>2200	0.1	2.6	n.g.
Alternaria kikuchiana	220	38	52	180
Aspergillus fumigatus	680	30	n.g.	n.g.
Aspergillus viride-mutans	266	2.1	48	n.g.
Paecilomyces variotii	460	6.5	28	140
Penicillium notatum	87	1.8	21	n.g.
Candida albicans	220	22	13	22
Candida guillermondii	>2200	50	340	n.g.
Dipodascus magnusii	>2200	>2200	>2200	n.g.
Hansenula anomala	170	12	7	86
Nadsonia fulvescens	410	8.7	2.4	65
Pichia farinosa	>2200	44	42	220
Saccharomyces cerevisiae	680	24	28	86
Saccharomycopsis lipolytica	>2200	56	180	460
Schizosaccharomyces pombe	460	19	460	92
Yarrowia lipolytica	>2200	4	680	n.g.
Chaetomium globosum	460	44	100	340
Rhodotorula rubra	110	37	46	340
Sordaria macrospora	310	7.6	20	80
Ustilago maydis	>2200	>2200	>2200	>2200
Epidermomyces floccosus	>2200	>2200	>2200	>2200
Microsporum gypseum	>2200	2200	460	2200
Trichophyton mentagrophytes	>2200	2200	>2200	>2200
Scopulariopsis	680	56	>2200	n.g.

(L_1: Leucanicidin, L_2: Bafilomycin-A_1-21-O-(α-L-rhamnopyranosid))

Bafilomycine								
L_1	L_2	P	V_2	W_1	X_1	X_2	G	A_{Ile}
120	8.9	340	>2200	>2200	60	>2200	>2200	300
n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	>2200	>2200	>2200	>2200	n.g.
72	36	2200	>2200	>2200	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	>2200	>2200	n.g.
n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	>2200	>2200	>2200	680
57	160	2200	>2200	>2200	>2200	>2200	>2200	1100
n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	680	680	1100	>2200
n.g.	170	2200	>2200	>2200	680	215	>2200	860
n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
52	49	460	>2200	>2200	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
37	32	180	>2200	>2200	56	41	680	46
180	110	>2200	>2200	>2200	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
48	57	>2200	>2200	>2200	36	28	680	300
340	>2200	>2200	>2200	>2200	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
80	110	>2200	>2200	>2200	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
74	140	>2200	>2200	>2200	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
140	220	2200	>2200	>2200	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
76	60	100	>2200	120	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
>2200	>2200	>2200	>2200	>2200	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
>2200	>2200	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
2200	>2200	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
>2200	>2200	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.

Alle getesteten Bafilomycine zeigten nur schwache antibakterielle Aktivität, und zwar fast ausschließlich gegen grampositive Keime. Bei Bacillus brevis wurde beobachtet, daß die Wirkung vom verwendeten Testmedium abhängig war. In chemisch definiertem Medium war die Bafilomycin-Wirkung deutlich besser als in komplexem Medium. Von den gramnegativen Keimen wurde nur Xanthomonas campestris gehemmt, und zwar durch Bafilomycin B_1 und auch gut durch C_1. Die Tabelle 18 zeigt die Bafilomycin-empfindlichen Keime.

Tab. 18: Antibakterielle Wirkung von Bafilomycin A_1, B_1 und C_1 (Hemmhof in mm, Konzentration 1 mg/ml)

Mikroorganismus	HH (mm)		
	A_1	B_1	C_1
Bacillus brevis	-	10/14	14/20
Bacillus cereus	-	9	12
Brevibacterium flavum	-	Sp	-
Clostridium pasteurianum	8	8	10
Corynebacterium glutamicum	-	-	11
Corynebacterium insidiosum	-	-	10
Streptomyces glaucescens	-	-	9
Streptomyces viridochromogenes	-	-	10
Xanthomonas campestris	-	12	23

3.4.2. Wirkung gegen Nematoden

Im Test mit Caenorhabditis elegans war das Bafilomycin B_1 (LD_{50} zwischen 10 und 50 µg/ml) die aktivste Verbindung vor Bafilomycin C_1 (LD_{50} ca. 50 µg/ml). A_1 und die restlichen getesteten Verbindungen waren in Konzentrationen zwischen 10 und 50 µg/ml etwa gleich aktiv (LD_{50} > 50 µg/ml). Das Ergebnis des Tests ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tab. 19: Wirkung von Bafilomycin-Derivaten auf die Vitalität von Caenorhabditis elegans A2

Substanz	Konz. (µg/ml)	Auswertung 48 h unbew.(%)	tot(%)	Auswertung 120 h unbew.(%)	tot(%)
A_1	50	28	4	100	37
	10	24	2	100	27
B_1	50	89	8	100	73
	10	47	0	100	43
C_1	50	100	0	100	56
	10	47	0	100	12
L_1	50	86	0	100	25
	10	36	0	100	17
L_2	50	64	0	100	36
	10	29	0	100	13
X_1	50	73	3	100	40
	10	0	0	100	30
V_2	50	80	3	100	26
	10	7	0	100	18
W_1	50	37	0	100	30
	10	7	0	100	25
W_2	50	63	2	100	36
	10	7	0	100	22
Kontrolle		7	0	100	17

3.4.3. Inhibition der Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere

Die Hemmung der Aktivität der Na^+K^+-ATPase durch die Bafilomycine und zum Vergleich durch Ouabain zeigt die Abbildung 16.

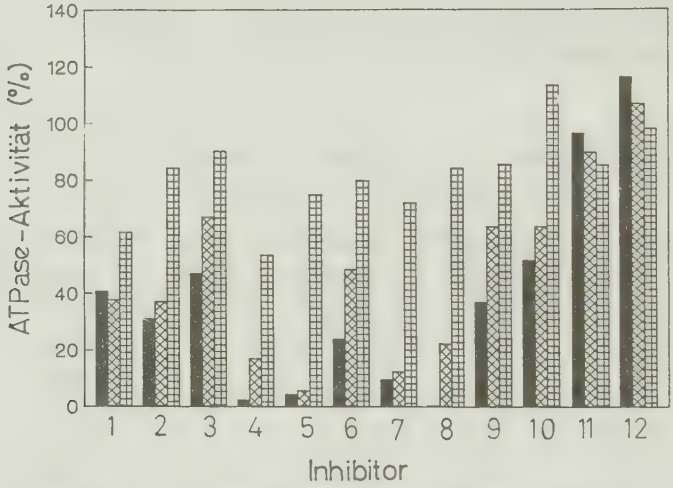


Abb. 16: Hemmung der Na^+K^+-ATPase-Aktivität durch Ouabain und Bafilomycine
1: Ouabain 2: Baf. A_1 3: Baf. A_{Ile} 4: Baf. B_1
5: Baf. C_1 6: Baf. D 7: L_1 8: L_2 9: Baf. P
10: Baf. V_2 11: Virustomycin A 12: Flavensomycinsäure
Konz.: ■ 100 µM ▨ 10 µM ▦ 1 µM

Die Bafilomycine B_1, C_1, D und die Bafilomycin-Glykoside erwiesen sich im Test als die stärksten ATPase-Inhibitoren. Bei einer Konzentration von 100 µM Bafilomycin war die ATPase-Aktivität fast völlig unterdrückt. Bafilomycin A_1, A_{Ile}, P und V_2 hemmten in dieser Konzentration die ATPase-Aktivität um ca. 60 %. Virustomycin A und Flavensomycinsäure zeigten keine Hemmwirkung. Bafilomycin W_1 war nicht getestet worden.

4. DISKUSSION

4.1. Biosynthese der Bafilomycine

Die Biosynthese des macrocyclischen Lactonringes von Makroliden verläuft auf dem der Fettsäuresynthese ähnlichen Weg der Polyketidbiosynthese durch die Kondensation von Acyl-Co A-Einheiten an ein Startermolekül (BU'LOCK, 1979). HENSENS et al. (1983) klärten durch Verfütterung ^{13}C-markierter Vorstufen die Herkunft der Acyl-Bausteine der Bafilomycine weitgehend auf. Danach setzen sich die Bafilomycine aus vier Acetat- und sieben Propionat-Einheiten zusammen (Abb. 17), die an das vermutlich vom Valin stammende Startermolekül Isobutyryl-Co A ankondensiert werden. Über die Biosyntheseschritte im einzelnen ist nichts bekannt, die Bildung des Aglycons kann aber durch bei der Makrolid-Biosynthese übliche Oxidations- und Reduktions-Reaktionen an der hypothetischen Poly-ß-ketosäure erklärt werden.

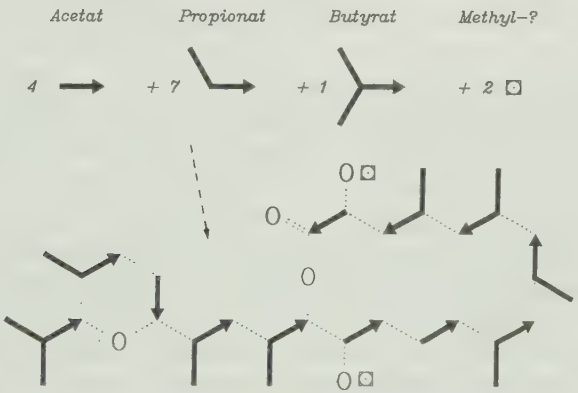
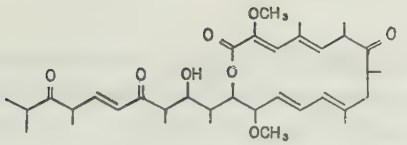


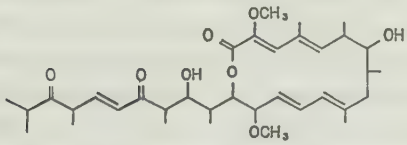
Abb. 17: Biosyntheseschema der Bafilomycine (nach HENSENS et al., 1983)

An den C-Atomen 2 und 14 wird eine Methylgruppe nachträglich in das Bafilomycin-Aglycon eingeführt. Die Methylierung scheint bei der Bafilomycin-Biosynthese der Biosyntheseschritt zu sein, der zu den biologisch aktiven Verbindungen führt. Dafür sprechen bei der Suche nach Bafilomycin-Nichtproduzenten gefundene Mutanten (Tü 2599-1-215 und -1-242), die hydrophile, vermutlich Bafilomycin-ähnliche Substanzen bildeten, die auch bei der Hemmung der Methylierung durch Ethionin oder Sulfadiazin auftraten. Als O-Methyltransferase, die den Aglycon-Teil eines Makrolids über S-Adenosylmethionin methyliert, wurde bisher nur die Avermectin B_2 O-Methyltransferase beschrieben (SCHULMAN et al., 1986a). Die Macrocin O-Methyltransferase (SENO & BALTZ, 1981, 1982) und die Erythromycin O-Methyltransferase (CORCORAN, 1975) methylieren die Zuckereinheiten der entsprechenden Makrolide.

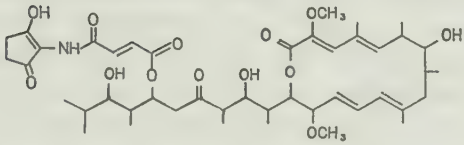
Aus Str. griseus konnten nativ weitere Bafilomycine ohne Tetrahydropyranring und Oxohygrolidin (Abb. 18, DEEG et al., 1987, KRETSCHMER et al., 1985) isoliert werden. Diese Verbindungen dürften Zwischenprodukte in der Biosynthese sein. Die Bafilomycine D (Abb. 1b) und F lassen sich durch Reduktionsschritte am C-7 und C-23 aus Bafilomycin G herleiten. Bafilomycin E wäre die Vorstufe des Bafilomycins B_1. Um dies zu beweisen, müßten Mutanten gesucht werden, die diese Zwischenprodukte anhäufen, denn es kann bisher nicht ausgeschloßen werden, daß Bafilomycin E ein Zerfallsprodukt von B_1 ist. Interessant ist, daß auch das Oxohygrolidin nativ nachgewiesen werden konnte. Beim Oxohygrolidin bildet Propionyl-Co A den Starter der Polyketidkette, außerdem müssten sich die C-Atome 1 und 2 aus einer Propionat-Einheit herleiten, während sie bei den Bafilomycinen von einer Acetat-Einheit stammen. Str. griseus baut also vermutlich unterschiedliche Acyl-Co A-Einheiten in das Bafilomycin-Molekül ein. Die Polyketidkette selbst bietet so Ansatzpunkt für eine biologische Modifikation, zum Beispiel durch Verfütterung kurzkettiger Fettsäuren.



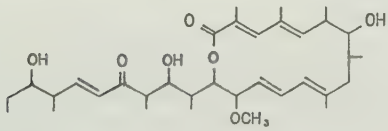
Bafilomycin G



Bafilomycin F



Bafilomycin E



Oxohygrolidin

Abb. 18: Bafilomycine F, G (DEEG et al., 1987), Bafilomycin E, Oxohygrolidin (KRETSCHMER et al., 1985)

Die Biosynthese des 2-Amino-3-hydroxycyclopent-2-enon-Anteils im Bafilomycin B_1 ist an anderen Verbindungen untersucht: NAKAGAWA et al. (1985) fanden bei der Verfütterung ^{14}C-markierter Vorstufen, daß er sich im Asukamycin durch eine intramolekulare Cyclisierung aus 5-Aminolävulinsäure herleitet. Dieser Weg wurde auch für das Reductiomycin beschrieben (BEALE et al., 1986). Die bei den Bafilomycin-Glykosiden gefundene Rhamnose stammt aus dem Zuckerstoffwechsel.

Die weiteren im Verlauf der Arbeit isolierten Nicht-Produzenten bieten keinen Anhaltspunkt über den genauen Verlauf der Biosynthese. Die von den Mutanten in geringen Mengen gebildeten Bafilomycine lassen vermuten, daß es sich dabei um Regulationsmutanten handelt. Für eine genaue Abklärung der

Biosynthese ist eine wesentlich größere Zahl von Mutanten notwendig. Bei der Mutagenese des Bafilomycin-Produzenten wurden aus ca. 1000 getesteten Kolonien 3 echte Nichtproduzenten isoliert, das entspricht etwa 0.3 % der getesteten Kolonien. WEBER et al. (1985) nutzten für ihre Untersuchungen zur Erythromycin-Biosynthese 33 Nichtproduzenten von Str. erythraeus, die sie aus über 12000 mutagenisierten Kolonien isoliert hatten (0.2 %). BALTZ & SENO (1981) fanden bei der Tylosin-Biosynthese unter 6000 Kolonien 72 blockierte Mutanten (1.2 %).

4.2. Gerichtete Fermentation

Bei der Optimierung des 'resting cell'-Systems für Str. griseus waren am Ende der Trophophase geerntete Zellen für die Übertragung in chemisch definiertes Produktionsmedium am geeignetsten. Im Gegensatz dazu wurden bei Untersuchungen an der ß-Lactam-Biosynthese von Cephalosporium (DEMAIN & KENNEL, 1978, BEHMER & DEMAIN, 1983) und Streptomyces clavuligerus (HU et al., 1984) und der Nikkomycin-Biosynthese (WALZ, 1986) mit Zellen aus der frühen exponentiellen Wachstumsphase bessere Ergebnisse erzielt. Die Aktivität der ß-Lactam-Biosyntheseenzyme war zu diesem Zeitpunkt am höchsten und nahm dann stark ab.

Das Wachstum von Streptomyces griseus konnte im 'resting cell'-System durch die Verwendung eines Mediums ohne Phosphatzusatz nicht verhindert werden. Man müsste deshalb eher von einem 'producing cell'-System sprechen. Auf die Versuche zur Biotransformation hatte das Wachstum nur einen geringen Einfluß, Produktionssteigerungen konnten allerdings nur anhand der spezifischen Produktionsrate der Zellen beurteilt werden. Bei der Anzucht im RC-Medium wurden Phosphatkonzentrationen unter 1 mM festgestellt, die noch keinen inhibie-

renden Effekt auf die Antibiotika-Produktion haben dürften (CRUEGER & CRUEGER, 1982).

Durch gerichtete Fermentation war eine Modifikation des Bafilomycinmoleküls möglich. Dabei führte die Zugabe verzweigtkettiger Aminosäuren zur Stimulation und zur Modifikation der Bafilomycin-Produktion. Beide Effekte sind bei Streptomyceten beschrieben. OMURA et al. (1983a) wiesen am Tylosin und Leucomycin die Funktion des Valins als Vorstufe von n-Butyrat- und Propionat-Einheiten nach. Die bei der Verfütterung von Leucin beobachtete geringe Bafilomycin-Produktionssteigerung dürfte analog dazu auf die Umwandlung des Leucins in Acetyl-Co A zurückzuführen sein. Dieser Weg ist von verschiedenen biologischen Systemen bekannt (LEHNINGER, 1975).

Die Modifikation konnte durch die Verfütterung hoher Konzentrationen Isoleucin erreicht werden. Dies zeigt das Auftreten des Bafilomycins A_{Ile}. Zum endültigen Beweis der Bildung der entsprechenden, Bafilomycin B_1- und C_1-analogen Verbindungen fehlt die Aufklärung der Strukturen. Für die Bereitstellung ausreichender Mengen der zu B_1 und C_1 analogen Verbindungen bietet sich Streptomyces michiganiensis Tü 2745 an, der wesentlich höhere Produktionsraten an Bafilomycin B_{Ile} und C_{Ile} zeigte. Daß die analogen Substanzen erst ab einer Konzentration von 50 mM Isoleucin gebildet wurden, kann auf die Spezifität der Biosyntheseenzyme für das natürliche Substrat zurückgeführt werden. Erst durch hohe Konzentrationen Isoleucin wird Isobutyryl-Co A als Startermolekül durch Methylbutyryl-Co A verdrängt.

Als weiteres mögliches Startermolekül muß Propionyl-Co A angenommen werden, das in das aus Str. griseus isolierte Oxohygrolidin eingebaut wird. Interessant wäre, ob Propionyl-Co A auch als Starter der Bafilomycin-Polyketidkette dienen kann, oder ob eine andere Polyketidsynthetase für die Biosynthese des Oxohygrolidins verantwortlich ist.

Die Verfütterung von verzweigtkettigen Aminosäuren führt auch bei anderen Antibiotika-Bildnern zu Verschiebungen im Substanzspektrum. ZMIJEWSKI et al. (1986) beschrieben von Streptomyces roseosporus, daß die Zugabe von Valin oder Isoleucin zum Fermentationsmedium das Startermolekül der an ein cyclisches Peptid gebundenen Fettsäuren bestimmte. Bei der Paulomycin-Fermentation konnte durch Verfütterung von Valin und Isoleucin (6 g/l = ca. 50 mM) die Bildung von Paulomycin A oder B induziert werden (MARSHALL et al., 1984). Paulomycin A und B sind Ester von Isobutyrat bzw. 2-Methylbutyrat.

Die verzweigtkettigen Aminosäuren werden nach Desaminierung über die entsprechenden α-Ketosäuren in Acyl-Co A-Einheiten umgewandelt. Bei der Verfütterung von α-Ketosäuren wurde die Bildung von Substanzen beobachtet, die den Bafilomycinen sehr ähnliche UV-Spektren zeigten. Ob und an welcher Stelle die angebotenen α-Ketosäuren Phenylglyoxylsäure, Cyclopropylglyoxylsäureamid und α-Oxononansäureamid in das Bafilomycin-Molekül eingebaut wurden, kann nur durch die Aufklärung der Struktur der Verbindungen gezeigt werden. Einige Analoga von Isoleucin und Valin zeigen Ähnlichkeit mit Phenylglyoxylsäure und Cyclopropylglyoxylsäureamid (z.B. 3-Cyclohexenyl-1-glyoxylsäure, DORGERLOH, 1980). Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit des Cyclopropylglyoxylsäureamids scheint ein Einbau als Startermolekül der Polyketidkette denkbar. Zunächst sollte aber geklärt werden, ob die induzierten Substanzen nicht von Str. griseus modifiziert werden und Bafilomycin-ähnliche Verbindungen vortäuschen. Dies wurde bei Str. tendae beobachtet, der bei Verfütterung von Anthranilsäure Anthranilsäureamid produzierte (KURTH, 1981). Die angebotenen Vorstufen konnten mittels DC oder HPLC von den induzierten Verbindungen unterschieden werden. Für eine weitere Charakterisierung reichte jedoch das Material nicht aus.

Eine aromatische Substituierung am C-Atom 23 der Bafilomycine dürfte einen größeren Effekt auf die Wirksamkeit der Verbindungen haben als der Ersatz der Isopropyl- durch eine

Methylpropylgruppe. Von Interesse ist eine solche Substituierung am Startermolekül nicht nur für die Bafilomycine, sondern auch für andere Makrolide. Gerade bei der Gruppe der Avermectine (BURG et al., 1979, MILLER et al., 1979, SCHULMAN et al., 1986b) oder Milbemycine (MISHIMA et al., 1975, 1983), wo verschiedene Moleküle als Starter der Polyketidkette dienen können, wäre eine derartige Modifizierung erwünscht.

Aromatische Aminosäuren und verwandte Substanzen sind Bestandteil verschiedener Antibiotika (WERNER, 1982). Für die Makrolid-Biosynthese interessante Beispiele sind das Heptaenpolyen Candicidin (MARTIN & LIRAS, 1976) und das Macrolactam Rifamycin (KARLSSON et al., 1974). Bei beiden Substanzen stellen aromatische Verbindungen, die über den Shikimisäureweg gebildet werden, die Startereinheit der Polyketidkette dar. Beim Candicidin leiten sich die Bestandteile p-Aminoacetophenon und N-Methyl-p-Aminoacetophenon vermutlich vom p-Aminobenzoyl-Co A ab (MARTIN, 1984). Auch in Pflanzen sind aromatische Starter für Polyketide (Anthrachinone, Phenylpropanderivate, Flavonoide) weit verbreitet (BU'LOCK, 1979, FROHNE & JENSEN, 1979).

Bei der Verfütterung von aromatischen Aminosäuren konnten keine auf Bafilomycine hindeutenden Substanzen gefunden werden. Überraschenderweise wurde die Bafilomycin-Produktion durch die Supplementierung mit Phenylalanin und Phenylpyruvat stark stimuliert. Dabei wurde die spezifische Produktionsrate um den Faktor 4 erhöht. Die Ursache der Stimulation dürfte im Abbauweg des Phenylalanins zu suchen sein. Zahlreiche Bakterien bauen die aromatischen Aminosäuren über Tyrosin und p-Hydroxyphenylpyruvat zu Fumarat und Acetoacetat ab (GOTTSCHALK, 1979). Dies würde die besonders starke Stimulation des Bafilomycins C_1, das als C_{21}-Substituent Fumarsäure enthält, erklären. Dem widersprach, daß weder Tyrosin noch p-Hydroxyphenylpyruvat einen Effekt auf die Produktion zeigten. Phenylalanin kann auch über Phenylpyruvat zu Phenylacetyl-L-Glutamin, Phenylacetaldehyd oder Benzaldehyd metabolisiert

werden. Bei der Transaminierung des Phenylpyruvats zu Benzaldehyd entsteht Oxalat, das zu Fumarat umgewandelt werden könnte. Für diesen Weg spricht, daß bei Verfütterung von Oxalsäure im komplexen Medium die Bafilomycin-Produktion stimuliert werden konnte (BAUMGARTNER, 1985). Wie Untersuchungen bei der Tylosin-Biosynthese zeigten, kann der Aminosäurestoffwechsel aber auch unspezifisch bei der Biosynthese von Makroliden eine wesentliche Rolle spielen. Dort konnte durch Supplementation des Anzuchtmediums mit Glutamat die Tylosin-Produktion um den Faktor 2.5 gesteigert werden, obwohl Glutamat keine direkte Vorstufe des Tylosins ist (SENO & HUTCHINSON, 1986).

Die Verfütterungseffekte konnten bedingt miteinander kombiniert werden. Bei der gleichzeitigen Verfütterung von Isoleucin und Phenylalanin wurde das gebildete Spektrum zu den neuen Verbindungen hin verschoben. Auch sogenannte 'minor components konnten durch Zugabe von Phenylalanin stimuliert werden. An der Verfütterung von Cyclopropylsäureamid und -Oxononansäureamid war zu sehen, daß durch eine gleichzeitige Phenylalanin-Verfütterung die neuen Peaks stimuliert wurden. Die Kombination von Valin mit Phenylglyoxylsäure in verschiedenen Konzentrationen führte ebenfalls zu einer deutlichen Stimulierung der Produktion. Worauf diese Stimulierung beruht, kann nur vermutet werden. Valin bewirkte in höheren Konzentrationen eine Bafilomycin A_1, B_1 und C_1-Steigerung, nicht aber eine Induktion des neuen Peaks. Daher könnte vermutet werden, daß es in hohen Konzentrationen nicht durch Phenylglyoxylsäure als Startermolekül verdrängt werden konnte.

4.3. Blockieren der Biosynthese

Die Bafilomycin-Biosynthese konnte durch Zugabe von Ethionin oder Sulfadiazin bei der Anzucht von Ethionin- bzw. Sulfadiazin-resistenten Mutanten von Str. griseus blockiert werden. Die hydrophilen Substanzen, die bei der Verfütterung auftraten, sind vermutlich demethylierte Bafilomycine. Dafür sprechen mehrere Beobachtungen: Die hydrophilen Substanzen traten sowohl bei der Verfütterung von Ethionin als auch von Sulfadiazin auf. Ethionin und Sulfadiazin greifen in die Methylierungsreaktion ein. Ethionin verhindert als strukturanaloge Substanz zum Methionin die Bildung von S-Adenosylmethionin, Sulfadiazin hemmt als Sulfonamid die Biosynthese der Folsäure, die zur Methylierung von S-Adenosylhomocystein zu S-Adenosylmethionin notwendig ist. Bei einer Reihe von Antibiotika konnten Ethionin (Tetracycline, DULANEY et al., 1962; Lincomycine, ARGOUDELIS et al., 1970, 1973; Carminomycinon, BLUMAUEROVA et al., 1979, Tetracenomycin, LAZAR et al., 1981) oder Sulfonamide (Tetracycline, NEIDLEMAN et al., 1963, Lincomycine, ARGOUDELIS et al., 1973) zur Bildung demethylierter Verbindungen eingesetzt werden. Auch die mittels Photodiodenarraydetektion aufgenommenen UV-Spektren der Verbindungen weisen zumindest für die Verbindung I auf eine Verwandtschaft zu den Bafilomycinen hin. Für diese Vermutung spricht auch, daß die Verbindungen bei Nichtproduzenten von Str. griseus (Tü 2599-1-215 und -1-242) wiedergefunden wurden. Es könnte sich also um Vorstufen der Bafilomycine handeln, die auf Grund des genetischen Blocks nicht weiter umgewandelt und angehäuft werden.

Bei der Avermectin-Produktion konnten demethylierte Avermectine durch die Zufütterung von Sinefungin gefunden werden (SCHULMAN et al., 1985). Sinefungin ist ein Strukturanalogon zum S-Adenosylmethionin und hemmt verschiedene Methyltransferasen (VEDEL et al., 1978, BORCHARDT et al., 1979). Versuche, im 'resting cell'-System Sinefungin an Str. griseus

zu verfüttern, führten nicht zur Bildung neuer, eventuell demethylierter Verbindungen.

4.4. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Streptomyceten

Die Verfütterungsergebnisse konnten teilweise auf andere Streptomyceten-Stämme übertragen werden. Bei Str. viridochromogenes konnte die Venturicidin-Produktion, bei Str. spec. NRRL 5739 die Milbemycin-Produktion stimuliert werden. Allerdings müßte man bei weiteren Versuchen die Konzentration und der Zugabezeitpunkt von Stamm zu Stamm optimieren. Ein wichtiger Faktor bei der Übertragung der Ergebnisse sind die Regulationsvorgänge bei der Biosynthese von Antibiotika, die bei Str. griseus auf Grund der guten Produktionsraten außer Acht gelassen wurden. Bei der Verfütterung von Phenylalanin in hohen Konzentrationen wird eine große Menge Stickstoff freigesetzt, der sich über die N-Repression negativ auf die Antibiotika-Bildung auswirken kann (AHARONOWITZ, 1980). Angedeutet wurde dieser Effekt durch die besseren, mit Phenylpyruvat erzielten Ergebnisse. Beim Bafilomycin-Produzenten wurden allerdings bei hohen Valin- oder Isoleucinkonzentrationen nur schwache reprimierende Effekte festgestellt.

TANAKA et al. (1981) und OMURA et al. (1980a, b) zeigten bei Makroliden (Leucomycin, Tylosin und Spiramycin) eine starke N-Regulation auf. Der Mechanismus der N-Regulation wurde am Tylosin genauer untersucht (TANAKA et al., 1986). Dort wurde gezeigt, daß NH_4^+ den Succinat und Aminosäurestoffwechsel inhibiert und somit für die Tylosin-Biosynthese weniger Vorstufen zur Verfügung stehen. Der Abbau von längeren Fettsäuren (Palmitat) und die Kondensation von kurzkettigen Fettsäuren zum Protylonolid werden durch Ammonium nicht inhibiert. Dies würde bedeuten, daß offenbar nicht die Polyketidsynthetase

selbst, sondern Enzyme des Succinat-Stoffwechsels der N-Regulation unterliegen.

Bei Str. spec. NRRL 5739 ließ sich die Milbemycin-Produktion auch durch Phosphoglyceride gut stimulieren. Dies kann vermutlich auf die bessere Verfügbarkeit von Acyleinheiten zurückgeführt werden. Versuche mit den Bafilomycin-Produzenten Str. olivaceus Tü 1907, Str. griseus Tü 2437 und Tü 2599 in komplexen Medien hatten schon gezeigt, daß die Bafilomycin-Produktion durch Zugabe von Sojaöl stimuliert werden kann (BAUMGARTNER, 1985, BLANK, 1984). Allerdings ließ sich wie bei der Bafilomycin-Produktion (Tab. 4) die Verfütterung der Phosphoglyceride nicht mit der Verfütterung von Phenylalanin verbinden. Die Gründe dafür sind unklar. Möglich wäre, daß durch den schlechteren Sauerstoffeintrag in das Medium bei Zugabe von Phosphoglyceriden ein aerober Abbau des Phenylalanins (über Tyrosin ?) behindert wird. Nicht erklärt werden kann, warum die Phosphoglyceride selbst zu keiner Produktionssteigerung führten.

4.5. Versuche zur Bildung von Hybrid-Antibiotika

Für die Biotransformation bedeutete die Entwicklung von molekulargenetischen Methoden für Streptomyceten die Möglichkeit, durch Protoplastenfusion oder durch Protoplastentransformation Rekombinanten zu erzeugen, die Hybridantibiotika bilden sollten. Die Rekombinationsfrequenzen liegen bei Protoplastenfusionen im Vergleich zu Kreuzungen (10^{-7} - 10^{-9}) um Zehnerpotenzen höher. Bei intraspezifischen Protoplastenfusionen wurden Rekombinationsfrequenzen zwischen 10^{-1} und 10^{-3}, bei interspezifischen Fusionen zwischen 10^{-5} und 10^{-7} erreicht (RHODES, 1986, HOPWOOD, 1981b). Die Bildung von Hybrid-Antibiotika auf genetischem Weg ist nicht oft beschrieben: Durch Protoplastenfusion von Str. hygroscopicus (Turimycin) und

Str. violaceus (Violamycin) konnten Rekombinanten erhalten werden, die ein neues Antibiotikum, Iremycin, produzierten (SCHLEGEL, et al. 1980a, b)). Rekombinanten aus einer Fusion von Str. rimosus und Str. kanamyceticus bildeten Neomycin, während die Elternstämme Paromomycin bildeten (MAZIERES et al., 1981). Die Mederrhodine A und B sind die bisher einzigen Beispiele dafür, daß Hybridantibiotika auf dem Weg der Protoplastentransformation erzeugt werden können. Str. spec. AM 7161 produzierte nach der Transformation mit Plasmiden, die Teile der Actinorhodin-Biosynthese enthielten, mit den Mederrhodinen A und B neue Antibiotika aus der Actinorhodin-Granaticin-Medermycin-Verwandtschaft (HOPWOOD et al., 1984; MALPARTIDA & HOPWOOD, 1984; OMURA et al., 1986b).

4.5.1 Protoplastierung und Protoplastenfusion

Auf Str. griseus konnten die in der Literatur beschriebenen Protoplastierungsbedingungen übertragen werden. Dabei wurden mit Zellen aus der spät logarithmischen Wachstumsphase gute Regenerationsraten erzielt. Dies entspricht den Beobachtungen von BALTZ (1978), der bei Str. fradiae und Str. griseofuscus am Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase stabile Protoplasten erreichte. HOPWOOD (1981b) zeigte, daß die Glycinkonzentration im Anzuchtmedium einen Einfluß auf die Protoplastierung hat, dieser Effekt wurde auch bei Str. griseus gefunden. Dort konnten nur bei Glycinkonzentrationen zwischen 0.1 und 0.5 % zufriedenstellende Regenerationsraten erzielt werden. BALTZ & MATSUSHIMA (1981) und PIGAC et al. (1982) betteten Protoplasten in Weichagar ein und erreichten bessere Regenerationsraten. THOMPSON et al. (1982) konnte die Regeneration durch das Trocknen der Regenerationsplatten verbessern. Beide von KUPER (1986) bei Str. tendae Tü 901 ausführlich untersuchten Effekte verbesserten auch bei Str. griseus die Regeneration deutlich.

Bei den Versuchen zur Protoplastierung von Str. avermitilis FH 1532 erbrachte erst die Variation des Anzuchtmediums reproduzierbare Regenerationsergebnisse. Der Stamm wuchs in dem für Str. griseus verwendeten Medium nur schlecht an. In dem von PIGAC et al. (1982) beschriebenen Medium ließen sich die Protoplasten auch nach Anzucht ohne Glycin gut regenerieren. Die regenerierten Kolonien bildeten allerdings kein Luftmycel mehr und verloren zu ca. 6 % die Fähigkeit zur Melaninbildung. Im Gegensatz zur Str. griseus regenerierte Str. avermitilis langsam, erste Kolonien waren auf den Platten erst nach 96 h - 120 h zu erkennen.

Zur Selektion der Stämme bei der Fusion wurden die Antibiotika-Resistenzen eingesetzt. Diese traten mit einer Wahrscheinlichkeit von $< 1 \times 10^{-7}$ auf, so daß die Rekombinanten eindeutig bestimmt werden konnten. Bei der intraspezifischen Fusion von Str. griseus und Mutanten wurden Rekombinationsraten zwischen 10^{-3} und 10^{-5} beobachtet, die damit unter den bei in der Literatur beschriebenen Fusionen erzielten Werten (s.o. 10^{-1} - 10^{-3}) lagen. Dies dürfte auf die nicht optimierten Fusionsbedingungen zurückzuführen sein. Bei dem Versuch, Str. griseus-Protoplasten interspezifisch mit Protoplasten von Str. avermitilis zu fusionieren, wurden keine Rekombinanten gefunden. Allgemein werden bei der interspezifischen Protoplastenfusion wesentlich geringere Rekombinationsraten erreicht als bei intraspezifischen Fusionen (RHODES, 1986), was auf mehrere Ursachen zurückgeführt werden kann: die Hemmung durch von den Fusionspartnern gebildete Antibiotika, das schnellere Wachstum eines Fusionspartners, die nicht ausreichende Homologie der Genome oder Restriktionsbarrieren. Ein Grund bei der versuchten Fusion von Str. griseus und Str. avermitilis dürfte in der langsamen Regeneration der Protoplasten von Str. avermitilis zu suchen sein. Allerdings war versucht worden, durch die Verdünnung der Fusionsansätze ein Überwachsen der Protoplasten zu vermeiden. Zu testen wäre, ob sich die Regeneration der Str. griseus-Protoplasten durch geringe Chloramphenicolmengen verzögern läßt. Dieser Effekt

wurde von SCHALL (1987) bei der Protoplastierung von Bacillus thuringiensis beschrieben.

4.5.2 Transformation

Die Versuche zur Produktion von Hybrid-Antibiotika mit Str. griseus führten nicht zur erhofften Modifikation der Bafilomycine.

Der Bafilomycin-Produzent Tü 2599 Str. griseus wurde mit dem 18.3 kB großen Plasmid pHM 57 transformiert, das die Biosynthesegene für die Polyketidkette des Tetracenomycins C enthielt. MOTAMEDI (1986b) hatte pHM 57 durch Klonieren der Tetracenomycin C-Biosynthesegene in den Vektor pIJ 702 konstruiert. pIJ 702 ist ein von KATZ et al. (1983) aus pIJ 101 entwickeltes, 5.8 kB großes multi copy-Plasmid (bis zu 400 Kopien/Genom) mit breitem Wirtsspektrum.

Die Transformationsversuche mit pIJ 702 zeigten, daß eine Transformation von Str. griseus auf der Grundlage des von HOPWOOD (1985) beschriebenen Transformationssystems möglich war. Die Transformation gelang sowohl mit dem Str. griseus-Wildstamm als auch mit den Nichtproduzenten. Um ausreichende Transformationsraten zu gewährleisten, wurden für die Transformationen hohe Plasmidmengen eingesetzt. Dabei lagen die Transformationsraten für pIJ 702 um etwa den Faktor 10 höher als für pHM 57, was durch die Größe von pHM 57 erklärt werden kann. Es könnte aber auch bedeuten, daß bei einem Teil der Transformanten die Tetracenomycin-Gene exprimiert werden und die dadurch intrazellulär erreichte Tetracenomycin-Konzentration zum 'Selbstmord' dieser Transformanten führt. Durch die Verwendung Tetracenomycin C-resistenter Stämme konnte die Transformationsrate mit pHM 57 um ca. den Faktor 10 erhöht werden. Dies läßt eigentlich eine Expression der Tetracenomycin-Gene vermuten.

Da allgemein die Übertragungsraten für wirtsfremde Plasmide auf Grund der ausgeprägten Restriktions- und Modifikationssysteme bei Streptomyceten niedriger als für eigene Plasmide liegen, wurde versucht, das zu transformierende Plasmid aus Transformanten zu isolieren und damit weiterzuarbeiten. Trotz der eindeutigen Marker (Thiostrepton-Resistenz, Melanin-Bildung) konnte weder pIJ 702 noch pHM 57 aus Transformanten isoliert und durch einen Verdau nachgewiesen werden. Dennoch war die Selektion auf den Thiostrepton- bzw. Tyrosinase-Marker eindeutig. Die Plasmide liegen vermutlich in den Transformanten nur in sehr geringer Kopienzahl vor und erschweren so den Nachweis. Dies spricht dafür, daß Str. griseus ein ausgeprägtes Restriktions- und Modifikationssystem besitzt, das auch die geringen Transformationsraten erklären würde. MATSUSHIMA et al. (1987) berichten von vermutlich mehreren Restriktionssystemen bei Str. fradiae, die durch aufeinanderfolgende Mutagenesen und jeweilige Selektion der Mutanten auf gute Transformierbarkeit ausgeschaltet werden konnten. Die Transformationseffizienz konnte so von ca. 10^1 Transformanten/μg DNA auf über 10^4 gesteigert werden. Von ENGEL (1987) konnte das Restriktionssystem von Str. tendae durch einen Hitzeschock bei der Regeneration der Protoplasten weitgehend ausgeschaltet werden. Zu prüfen wäre aber auch, ob eventuell die Plasmid-Aufarbeitung nicht auf Str. griseus übertragen werden kann.

4.6. Wirksamkeit von Bafilomycinen und Derivaten

In den Tests zur biologischen Wirkung wurden die Bafilomycine (Abb. 1a,b, Abb. 18, Abb. 19) und mit dem Virustomycin A ein verwandtes 18-gliedriges Makrolid (Abb. 1c) eingesetzt.

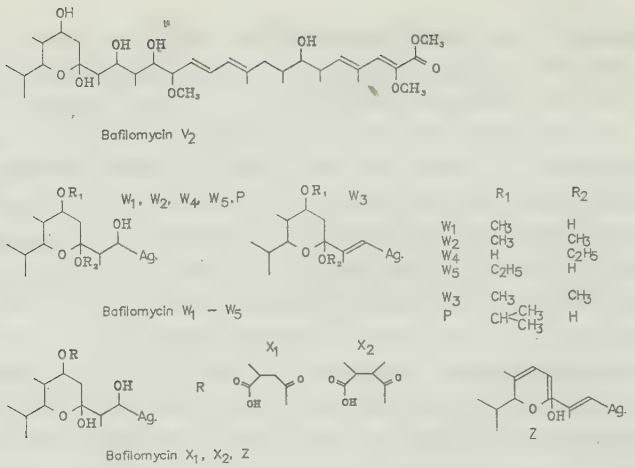


Abb. 19: Chemisch derivatisierte Bafilomycine (nach DEEG, 1987)
Ag. Bafilomycin-Aglycon (vgl. Abb. 1a)

Die biologischen Tests lassen folgende Schlüsse zu:

1) Die biologische Aktivität der Bafilomycine ist entscheidend vom Substituenten am C-Atom 21 abhängig. Bafilomycin B_1 ist im antifungischen, antiparasitischen und im Enzymtest die aktivste Substanz. Sitzt am C-Atom 21 kein Substituent, wie beim Bafilomycin A_1, sind die Verbindungen nur schwach aktiv. Auch SETO et al. (1984) fanden am Hygrolidin, daß die antifungische Wirkung stark von der von der Anwesenheit der Fumarsäuregruppe am C_{21} abhängt.
2) Die gute Wirksamkeit des Bafilomycins B_1 kann nicht auf die Flavensomycinsäure selbst zurückgeführt werden. Diese war in den Tests nicht aktiv.
3) Beim Bafilomycin C_1 ist zu sehen, daß die Substitution am C-21 auch zu einer qualitativ anderen, d.h. antibakteriellen Wirkung führen kann. Sehr interessant ist dabei, daß das Maleinylderivat Bafilomycin X_2 keine antibakterielle Wirkung hat. Die Stereochemie der Carbonsäure spielt für die antibakterielle Wirkung offenbar eine wichtige Rolle. BAUMGARTNER

(1985) stellte bei Untersuchungen zur Wirkungsweise der Bafilomycine eine stark ionophore Wirkung fest, die sie auf die Bildung eines K^+-Antibiotikum-Komplexes zurückführte. Da Bafilomycin C_1 auf chemisch definierten Medien eine wesentlich stärkere antibakterielle Wirkung zeigte, könnte die gute antibakterielle Wirkung des Bafilomycins C_1 auf den ionophoren Eigenschaften beruhen.

4) Der Makrolidring ist für die Wirkung wichtig. Substanzen mit geöffnetem Makrolidring zeigen keine Wirksamkeit.

5) Der Einfluß, den eine Substitution am C-Atom 23 haben könnte, kann nicht abgeschätzt werden. Das Ersetzen der Isopropylgruppe durch eine Methylpropylgruppe verändert die Wirksamkeit der Verbindung nicht.

6) Substanzen mit geöffnetem Tetrahydropyranring sind in den beschriebenen Tests aktiv. Die Ergebnisse von WILTON et al. (1985), die eine sehr schwache antifungische Wirkung der Verbindung PD 118,576 berichteten, zeigen die Schwierigkeiten, Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen in eine Beurteilung mit einzubeziehen.

7) Die Ergebnisse aus den biologischen Tests der Bafilomycine können nicht ohne weiteres auf die nah verwandten Makrolide übertragen werden. Das Virustomycin A war nur schwach antifungisch aktiv und hatte keine Wirkung auf die Na^+K^+-ATPase. OMURA et al. (1983c) hatten aus Versuchen zur Wirkungsweise des Virustomycins A geschlossen, daß es möglicherweise in das ATP-bildende System eingreift.

4.7. Ausblick

Die Ergebnisse der biologischen Tests verdeutlichen den Bedarf an weiteren, modifizierten Verbindungen, um eine klare Aussage über die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Bafilomycine treffen zu können. Erforderlich dazu sind vor allem Verbindungen, die nicht am C-Atom 21 variiert sind. Die bei

der gerichteten Fermentation und beim Blockieren der Bafilomycin-Biosynthese aufgetretenen Substanzen könnten diese Forderung erfüllen.

Ob diese Strukturen allerdings eine geringere Toxizität als die bisher bekannten Bafilomycine aufweisen, ist fraglich. Deshalb sollten weitere Modifikationsversuche trotz der erzielten negativen Ergebnisse weiterhin Hybrid-Antibiotika zum Ziel haben.

Die Chancen, auf welchem Weg Hybrid-Verbindungen am ehesten zu erreichen sind, sind schwer abzuschätzen. Bei der Protoplastenfusion müssten die Bedingungen für eine interspezifische Fusion von Bafilomycin- und Avermectin-Produzenten optimiert werden. Für eine Fusion bieten sich auch andere Stämme an, die den Bafilomycinen mehr oder weniger nahestehende Verbindungen bilden, z.B. Str. viridochromogenes Tü 342 (Venturicidin) oder Str. antibioticus Tü 99 (Chlorothricin). Auch eine Fusion von Str. lividans TK 24 pHM 57 mit Str. griseus ist denkbar, um pHM 57 in Str. griseus zu bringen. Dies hätte den Vorteil, daß dabei auch Tetracenomycin-Resistenzgene übertragen werden könnten.

Ein anderer Weg, Hybrid-Antibiotika zu erhalten, wurde von OMURA (1984) beschrieben. Er konnte an mehreren Beispielen zeigen, daß durch Cerulenin in der Makrolid-Biosynthese inhibierte Streptomyceten Makrolide verwandter Gruppen modifizieren können. Auch Str. griseus dürfte sich für derartige Versuche eignen, der Stamm verträgt hohe Supplementkonzentrationen und läßt sich gut im 'resting cell'-System kultivieren. Zu überlegen wäre, ob sich Protoplasten in Mikrotiterplatten für solche Untersuchungen eignen würden. Es müßte weniger Substanz eingesetzt werden, außerdem würde es Aufnahmeprobleme reduzieren und auch eine wesentliche Zeitersparnis bedeuten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Verfütterung von Isoleucin (> 50 mM) an Streptomyces griseus Tü 2599 konnten drei neue, Bafilomycin-analoge Substanzen induziert werden. Die Struktur des Bafilomycins A_{Ile} unterscheidet sich von der des Bafilomycins A_1 durch die Substitution der Isopropylgruppe am C-23 der Bafilomycine durch eine Methylpropylgruppe.

Durch Verfütterung von α-Ketosäuren wurde die Bildung von Substanzen induziert, deren UV-Spektrum starke Ähnlichkeit zum UV-Spektrum der Bafilomycine aufweist.

Phenylalanin und Phenylpyruvat führten in hohen Konzentrationen (> 50 mM) zu einer starken Produktionssteigerung bei Str. griseus. Dieser Effekt ließ sich auch bei Str. viridochromogenes Tü 342 und Str. spec. NRRL 5739 feststellen.

Durch Verfütterung von Ethionin bzw. Sulfadiazin an Ethionin- bzw. Sulfadiazin-resistente Stämme wurde die Bafilomycin-Produktion gehemmt. Dafür traten hydrophile Verbindungen auf, die vermutlich Bafilomycine sind.

pIJ 702 und pHM 57 konnten in Str. griseus Tü 2599 transformiert werden. Dabei konnten keine Hybrid-Antibiotika nachgewiesen werden. Die Fusion von Str. griseus und Str. spec. NRRL 5739 führte nicht zu Rekombinanten. Bei der intraspezifischen Fusion von Str. griseus wurden Rekombinanten mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-5} gefunden.

Die Aktivität von nativen und chemisch derivatisierten Bafilomycinen wurde in biologischen Tests vergleichend ermittelt.

6. LITERATUR

AHARONOWITZ, Y.: Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis.
Ann. Rev. Microbiol. 34, 209 - 233 (1980).

ARGOUDELIS, A.D., EBLE, T.E. & MASON, D.J.: Studies on the biosynthesis of Lincomycin.
J. Antibiot. 23, 1 - 8 (1970).

ARGOUDELIS, A.D., JOHNSON, L.E. & PYKE, T.R.: Effect of methylation inhibitors on fermentations of S. lincolnensis.
J. Antibiot. 26, 429 - 436 (1973).

BALTZ, R.H.: Genetic recombination in Streptomyces fradiae by protoplast fusion and cell regeneration.
J. Gen. Microbiol. 107, 93 - 102 (1978).

BALTZ, R.H. & MATSUSHIMA, P.: Protoplast fusion in Streptomyces: Conditions for efficient recombination and cell regeneration.
J. Gen. Microbiol. 127, 137 - 146 (1981).

BALTZ, R.H. & SENO, E.T.: Properties of Streptomyces fradiae mutants blocked in biosynthesis of the macrolide antibiotic Tylosin.
Antimicrob. Agents Chemother. 20, 214 - 225 (1981).

BAUMGARTNER, A.: Bafilomycine. Sekundärmetabolite aus Streptomyces griseus mit fungizider und insektizider Wirkung.
Dissertation Universität Tübingen (1985).

BEALE, J.M., LEE, J.P., NAKAGAWA, A., OMURA, S. & FLOSS, H.G.: Biosynthesis of the antibiotic Reductiomycin. J. Am. Chem. Soc. 108, 331 - 332 (1986).

BEHMER, C.J. & DEMAIN, A.L.: Further studies on carbon catabolite regulation of ß-lactam antibiotic synthesis in Cephalosporium acremonium. Curr. Microbiol. 8, 107 - 114 (1983).

BIBB, M.J., WARD, J.M. & HOPWOOD, D.A.: Transformation of plasmid DNA into Streptomyces at high frequency. Nature 274, 398 - 400 (1978).

BIBB, M.J., WARD, J.M. & HOPWOOD, D.A.: Development of a cloning system for Streptomyces. Dev. Ind. Microbiol. 21, 55 - 64 (1980)

BIRCH, A.J.: The biosynthesis of antibiotics. Pure Appl. Chem. 7, 527 - 537 (1963).

BITTMANN, H.: Persönliche Mitteilung (1987).

BLANK, W.: Untersuchungen zur Produktion, Fermentation und Isolierung neuer Bafilomycine aus Streptomyces olivaceus, Tü 1907. Diplomarbeit Universität Tübingen (1984).

BLUMAUEROVA, M., JIZBA, J., STAJNER, K., & VANEK, Z.: Effect of DL-ethionin on the biosynthesis of anthracyclines. Biotechnol. Lett. 1, 471 - 476 (1979).

BORCHARDT, R.T., EIDEN, L., BISHIA, W. & RUTLEDGE, C.: Sinefungin, a potent inhibitor of S-adenosylmethionine: protein O-methyltransferase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 919 - 924 (1979).

BRUFANI, M., CELLAI, L., MUSA, C. & KELLER-SCHIERLEIN, W.: Stoffwechselprodukte aus Mikroorganismen. 229. Venturicidin A und B.
Helv. Chim. Acta 55, 2329 - 2346 (1972).

BU'LOCK, J.D.: Polyketide biosynthesis.
In: Comprehensive organic chemistry, DARTON, D. & OLLIES, W.D. (Eds.), pp. 927 - 987, Pergamon Press, Oxford (1979).

BURG, R.W.; MILLER, B.M., BAKER, E.E., BIRNBAUM, J., CURRIE, S.A., HARTMAN, R., KONG, Y.L., MONAGHAN, R.L., PUTTER, I., TUNAC, J.B., WALLICK, H., STAPLEY, E.O., OIWA, R. & OMURA, S.: Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation.
Antimicrob. Agents Chemother. 15, 361 - 367 (1979).

CLARIDGE, C.A., BUSH, J.A., DOYLE, T.W., NETTLETON, D.E., MOSELEY, J.R., KIMBALL, D., KAMMER, M.F. & VEITCH, J.: New mitomycin analogs produced by directed biosynthesis.
J. Antibiot. 39, 437 - 446 (1986).

CORCORAN, J.W.: S-Adenosylmethionine: Erythromycin C O-Methyltransferase.
In: Methods in Enzymology, Vol. 43, HASH, J.H. (Ed.), pp. 487 - 498, Academic Press, New York (1975).

CRUEGER, W. & CRUEGER, A.: Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie.
Akad. Verlagsgesellschaft, Wiesbaden (1982).

DEEG, M.: Chemische Modifizierungen und Strukturuntersuchungen von Bafilomycinen.
Dissertation Universität Tübingen (1986).

DEEG, M., HAGENMAIER, H. & KRETSCHMER, A.: Chemical modification of bafilomycin-type 16-membered dienlactone macrolides.
J. Antibiot. 40, 320 - 328 (1987).

DELIC, V., HOPWOOD, D.A. & FRIEND, E.J.: Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in Streptomyces coelicolor.
Mut. Res. 9, 167 - 182 (1970).

DEMAIN, A.L.: Production of new antibiotics by directed synthesis and by the use of mutants.
In: The Future of Antibiotherapy and Antibiotic Research, NINET, L. et al. (Eds.), pp. 417 - 435, Academic Press, London (1981).

DEMAIN, A.L. & KENNEL, Y.M.: Resting-cell studies on carbon-source regulation of ß-lactam biosynthesis.
J. Ferment. Technol. 56, 323 - 328 (1978).

DORGERLOH, M.: Vehicle-Warhead-Konzept zur Aufnahme natürlicher und synthetischer Hemmstoffe.
Dissertation Universität Tübingen (1980).

DRAKE, J.W. & BALTZ, R.H.: The biochemistry of mutagenesis.
Annu. Rev. Biochem. 45, 11 - 37 (1976).

DULANEY, B.L., PUTTER, I., DRESCHER, D., CHAIET, L., MILLER, W.T., WOLF, F.T. & HENDLIN, D.: Transethylation in antibiotic synthesis. I. An ethyl homolog of Oxytetracycline.
Biochem. Biophys. Acta 60, 447 - 449 (1962).

ENGEL, P.: Plasmid transformation of Streptomyces tendae after heat attenuation of restriction.
Appl. Env. Microbiol. 53, 1 - 3 (1987).

FAWCETT, J.K. & SCOTT, J.E.: A rapid method for the determination of urea.
J. Clin. Path. 13, 156 - 159 (1960).

FIEDLER, H.-P.: Screening for new microbial products by high-performance liquid chromatography using a photodiode array detector.
J. Chromat. 316, 487 - 494 (1984).

FIEDLER, H.-P. & PLAGA, A.: Automated on-column derivatization of the antibiotics phosphinothricin and phosphinothricyl-alanyl-alanine with o-phthalaldehyde and microbore column high-performance liquid chromatography for quantitative determination in biological cultures.
J. Chromat. 353, 201 - 206 (1986).

FIEDLER, H.P. & PLAGA, A.: Separation of amino acids and antibiotics by narrow-bore and normal-bore high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization.
J. Chromat. 386, 229 - 241 (1987).

FROHNE, D., JENSEN, U.: Systematik des Pflanzenreichs.
G. Fischer Verlag, Stuttgart (1979).

GOETZ, M.A., McCORMICK, P.A., MONAGHAN, R.L., OSTLIND, D.A., HENSENS, D.O., LIESCH, J.M. & ALBERS-SCHONBERG, G.: L-155,175: A new antiparasitic macrolide. Fermentation, isolation and structure.
J. Antibiot. 38, 161 - 168 (1985).

GOTTSCHALK, G.: Bacterial metabolism.
Springer, New York (1979).

HENSENS, D.O., MONAGHAN, R.L., HUANG, L. & ALBERS-SCHÖNBERG, G.: Structure of the sodium and potassium ion activated adenosinetriphosphatase inhibitor L-681,110.
J. Am. Chem. Soc. 105, 3672 - 3679 (1983).

HOLLIDAY, R.: A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms.
Nature 178, 987 (1956).

HOPWOOD, D.A.: The isolation of mutants.
In: Methods in microbiology, Vol. 3A, NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W. (Eds.), pp. 363 - 433, Academic Press, London (1970).

HOPWOOD, D.A.: Future possibilities for the discovery of new antibiotics by genetic engineering.
In: ß-Lactam Antibiotics: Mode of Action, New Developments, and Future Prospects, SALTON, M.R.J. & SHOCKMAN, G.D. (Eds.), pp. 585 - 598, Academic Press, New York (1981a).

HOPWOOD, D.A.: Genetic studies with bacterial protoplasts.
Ann. Rev. Microbiol. 35, 237 - 272 (1981b).

HOPWOOD, D.A.: Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory manual.
The John Innes Foundation, Norwich (1985).

HOPWOOD, D.A., WRIGHT, H.M. & BIBB, M.J.: Genetic recombination through protoplast fusion in Streptomyces.
Nature 268, 171 - 174 (1977).

HOPWOOD, D.A. & CHATER, K.F.: New approaches to antibiotic production.
Trans. R. Soc. London, Ser. B 290, 313 - 328 (1980).

HOPWOOD, D.A., MALPARTIDA, F., KIESER, H.M., IKEDA, H., DUNCAN, J., FUJII, I., RUDD, B.A.M., FLOSS, H.G. & OMURA, S.: Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering.
Nature 309, 642 - 644 (1984).

HU, W.-S., BRANA, A.F. & DEMAIN, A.L.: Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cells of Streptomyces clavuligerus and its reversal by protein synthesis inhibitors.
Enzyme Microb. Technol. 6, 155 - 160 (1984).

HUANG, L., ALBERS-SCHÖNBERG, G., MONAGHAN, R.L., JAKUBAS, K., PONG, S.S., HENSENS, O.D., BURG, R.W., OSTLIND, D.A., CONROY, J. & STAPLEY, E.O.: Discovery, production and purification of the Na^+, K^+ activated ATPase inhibitor, L-681,110 from the fermentation broth of Streptomyces sp. MA-5038.
J. Antibiot. 37, 970 - 975 (1984).

HÜTTER, R., KELLER-SCHIERLEIN, W., NÜESCH, J. & ZÄHNER, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 48. Mitteilung. Scopamycine.
Arch. Microbiol. 51, 1 - 8 (1965).

ISOGAI, A., SAKUDA, S., MATSUMOTO, S., OGURA, M., FURIHATA, K., SETO, H. & SUZUKI, A.: The structure of Leucanicidin, a novel insectizidal macrolide produced by Streptomyces halstedii.
Agric. Biol. Chem. 48, 1379 - 1381 (1984).

KARLSSON, A., SARTORI, G. & WHITE, R.J.: Rifamycin biosynthesis. Further studies on origin of the ansa chain and chromophore.
Eur. J. Biochem. 47, 251 - 256 (1974).

KATZ, E., THOMPSON, C.J. & HOPWOOD, D.A.: Cloning and expression of the tyrosinase gene from Streptomyces antibioticus in Streptomyces lividans.
J. Gen. Microbiol. 129, 2703 - 2714 (1983).

KELLER-SCHIERLEIN, W.: Persönliche Mitteilung (1986).

KIESER, T.: Factors affecting the isolation of ccc-DNA from Streptomyces lividans and Escherichia coli.
Plasmid 12, 19 - 36 (1984).

KINASHI, H., SOMENO, K. & SAKAGUCHI, K.: Alkaline degradation products of Concanamycin A.
Tetrahedron Lett. 22, 3857 - 3860 (1981a).

KINASHI, H., SOMENO, K. & SAKAGUCHI, K.: Structure of Concanamycin A.
Tetrahedron Lett. 22, 3861 - 3864 (1981b).

KINASHI, H., SAKAGUCHI, K. HIGASHIJIMA, T. & MIYAZAWA, T.: Structures of Concanamycins B and C.
J. Antibiot. 35, 1618 - 1620 (1982).

KINASHI, H., SOMENO, K. & SAKAGUCHI, K.: Isolation and characterization of Concanamycins A, B and C.
J. Antibiot. 37, 1333 - 1343 (1984).

KNIPPERS, R. & HOFFMANN-BERLING, M.: A coat protein from bacteriophage fd. I. Hydrodynamic measurements and biological characterization.
J. Mol. Biol. 21, 281 - 292 (1966).

KRETSCHMER, A., DORGERLOH, M., DEEG, M. & HAGENMAIER, H.: The structures of novel insecticidal macrolides: Bafilomycins D and E and Oxohygrolidin.
Agric. Biol. Chem. 49, 2509 - 2511 (1985).

KRISCHKE, W.: Untersuchungen zur Funktion von -Cyclohexanfettsäuren in Bacillus acidocaldarius.
Dissertation Universität Tübingen (1986).

KUPER, S.: Optimierung eines Transformationssystems für Mutanten von Streptomyces tendae Tü 901.
Diplomarbeit Universität Tübingen (1986).

KURTH, R.: Untersuchungen zur Regulation der Nikkomycinbildung und Optimierung einer pO_2-feeding-Fermentation.
Dissertation Universität Tübingen (1981).

LAZAR, G. ZÄHNER, H., BREIDING, S., DAMBERG, M. & ZEECK, A.: 3-Demethoxy-3-ethoxytetracenomycin C.
J. Antibiot. 34, 1067 - 1068 (1981).

LEHNINGER, A.L.: Biochemistry
2nd ed., Worth. Publishers, New York (1975).

MALPARTIDA, F. & HOPWOOD, D.A.: Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a Streptomyces antibiotic and its expression in a heterologous host.
Nature 309, 462 - 464 (1984).

MARSHALL, V.P., CIALDELLA, J.I., FOX, J.A. & LABORDE, A.L.: Precursor directed biosynthesis of Paulomycins A and B. The effects of valine, isoleucine, isobutyric acid and 2-methylbutyric acid.
J. Antibiot. 37, 923 - 925 (1984).

MARSHALL, V.P. & WILEY, P.F.: Biomodification of antibiotics by Streptomyces.
In: The Bacteria, Vol. IX, Chapt. 9, GUNSALUS, J.C. (Ed.), Academic Press, New York (1986).

MARTIN, J.F.: Biosynthesis, regulation, and genetics of polyene macrolide antibiotics.
In: Macrolide antibiotics. Chemistry, biology, and practice, Chapter 10, OMURA, S. (Ed.), Academic Press, London (1984).

MARTIN, J.F. & LIRAS, P.: Rapid incorporation of precursors into Candicidin by resting cells of Streptomyces griseus.
J. Antibiot. 29, 1306 - 1309 (1976).

MATSUSHIMA, P., COX, K.L. & BALTZ, R.H.: Highly transformable mutants of Streptomyces fradiae defective in several restriction systems.
Mol. Gen. Genet. 206, 393 - 400 (1987).

MAZIERES, N., PEYRE, M. & PENASSE, L.: Interspecific recombination among aminoglycoside producing streptomycetes.
J. Antibiot. 24, 544 - 550 (1981).

MEYER, M. & KELLER-SCHIERLEIN, W.; DRAUTZ, H., BLANK, W. & ZÄHNER, H.: Bafilomycin-A_1-21-O-(-L-rhamnopyranosid): Strukturaufklärung durch chemische Verknüpfung mit Bafilomycin A_1 und Leucanicidin.
Helv. Chim. Acta 68, 83 - 94 (1985).

MEYER, V.: Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Diesterweg Salle Sauerländer, Frankfurt (1979).

MILLER, T.W.; CHAIET, L., COLE, D.J., COLE, L.J., FLOR, J.E., GOEGELMAN, R.T., GULLO, V.P., JOSHUA, J., KEMPF, A.J., KRELLWITZ, W.R., MONAGHAN, R.L., ORMOND, R.E., WILSON, K.E., ALBERS-SCHÖNBERG, G. & PUTTER, I.: Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties.
Antimicrob. Agents Chemother. 15, 368 - 371 (1979)

MISHIMA, H., KURABAYASHI, M., TAMURA, C., SATO, S., KUWANO, H. & SAITO, A.: Structure of milbemycin β_1, β_2 und β_3. Tetrahedron Lett. 10, 711 - 714 (1975).

MISHIMA, H., IDE, J., MURAMATSU, S. & ONO, M.: Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: structure determination of milbemycins D, E, F, G, H, J and K.
J. Antibiot. 36, 980 - 990 (1983).

MOTAMEDI, H., WENDT-PIENKOWSKI, E. & HUTCHINSON, C.R.: Isolation of Tetracenomycin C-nonproducing Streptomyces glaucescens mutants.
J. Bacteriol. 167, 575 - 580 (1986a).

MOTAMEDI, H., WENDT-PIENKOWSKI, E. & HUTCHINSON, C.R.: A cloned streptomyces gene cluster that encodes information for the biosynthese of an anthracycline antitumor antibiotic.
Preprint (1986b).

NAKAGAWA, A., WU, T.-S., KELLER, P.J., LEE, J.P., OMURA, S. & FLOSS, H.G.: Biosynthesis of Asukamycin. Formation of the 2-Amino-3-hydroxycyclopent-2-enone moiety.
J. Chem. Soc., Chem. Commun., 519 - 521 (1985).

NEIDLEMAN, S.L., BIENSTOCK, E. & BENNETT, R.E.: Biosynthesis of 7-chloro-6-demethyltetracycline in the presence of aminopterin and ethionin..
Biochem. Biophys. Acta 71, 199 - 201 (1963).

OMURA, S.: Philosophy of new drug discovery.
Microb. Rev. 50, 259 - 279 (1986a).

OMURA, S., TANAKA, Y., TANAKA, H., TAKAHASHI, Y., IWAI, Y.: Stimulation of the production of macrolide antibiotics by magnesium phosphate and related insoluble materials.
J. Antibiot. 33, 1568 - 1569 (1980a).

OMURA, S., TANAKA, Y., KITAO, C., TANAKA, H. & IWAI, Y.: Stimulation of Leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation.
Antimicrob. Agents Chemother. 18, 691 - 695 (1980b)

OMURA, S.; SHIMIZU, H., IWAI, Y., HINOTOZAWA, K., OTOGURO, K., HASHIMOTO, H., NAKAGAWA, A.: AM-2604 A, a new antiviral antibiotic by a strain of Streptomyces.
J. Antibiot. 35, 1632 - 1637 (1982a).

OMURA, S; TANAKA, Y., NAKAGAWA, A., IWAI, Y., INOUE, M. & TANAKA, H.: Irumamycin, a new antibiotic active against phytopathogenic fungi.
J. Antibiot. 35, 256 - 257 (1982b).

OMURA, S., IMAMURA, N., HINOTOZAWA, K., OTOGURO, K., LUKACS, G., FAGHIH, R., TOLMANN, R., ARISON, B.H. & SMITH, J.L.: The structure of Virustomycin A.
J. Antibiot. 36, 1783 - 1786 (1983a).

OMURA, S., TSUZUKI, K., TANAKA, Y., SAKAKIBARA, H., AIZAWA, M. & LUKACS, G.: Valine as a precursor of n-butyrate unit in the biosynthesis of macrolide aglycone.
J. Antibiot. 36, 614 - 616 (1983b).

OMURA, S. OTOGURO, K. & TANAKA, H.: The mode of action of a novel 18-membered macrolide, Virustomycin A (AM-2604 A), on Trichomonas foetus.
J. Antibiot. 36, 1755 - 1761 (1983c).

OMURA, S. & TANAKA, Y.: Macrolide biochemistry, regulation and genetics.
In: Macrolide antibiotics. Chemistry, biology, and practice, Chapter 5, OMURA, S. (Ed.), Academic Press, London (1984).

OMURA, S., IKEDA, H., MALPARTIDA, F., KIESER, H.M. & HOPWOOD, D.A.: Production of new hybrid antibiotics, Mederrhodins A and B, by a genetically engineered strain. Antimicrob. Agents Chemother. 29, 13 - 19 (1986b).

PIGAC, J., HRANUELI, D., SMOKVINA, T. & ALACEVIC, M.: Optimal cultural and physiological conditions for handling Streptomyces rimosus protoplasts. Appl. Env. Microbiol. 44, 1178 - 1186 (1982).

REUSCHENBACH, P.: Pigmente aus dem Streptomyceten aburaviensis var. tuftformis Tü 1250/8. Dissertation Universität Tübingen (1986).

RHODES, M.: Genetic recombination and maps for Streptomyces. In: The Bacteria, Vol. IX, Chapt. 2, GUNSALUS, J.C. (Ed.), Academic Press, New York (1986).

SANTO, L.: Suche nach Antibiotika mit Wirkungsschwerpunkt Clostridien: Tyrandamycin A und B. Dissertation Universität Tübingen (1976).

SCHALL, D.: Genübertragung zwischen Isolaten von Bacillus thuringiensis durch Protoplastentransformation und -fusion. Dissertation Universität Tübingen (1987).

SCHLEGEL,B. & FLECK, W.F.: New anthracycline antibiotics produced by interspecific recombinants of streptomycetes. I. Selection of Streptomyces violaceus subsp. iremyceticus, an Iremycin-producing subspecies. Z. Allg. Mikrobiol. 20, 527 - 530 (1980a).

SCHLEGEL, B., IHN, W. & FLECK, W.F.: New anthracycline antibiotics produced by interspecific recombinants of streptomycetes. II. Production of Iremycin. Z. Allg. Mikrobiol. 20, 531 - 534 (1980b).

SCHULMAN, M.D., VALENTINO, D., HENSENS, D.O., ZINK, D., NALLIN, M., KAPLAN, L, & OSTLIND, D.A.: Demethylavermectins. Biosynthesis, isolation and characterization.
J. Antibiot. 38, 1494 - 1498 (1985).

SCHULMAN, M.D., VALENTINO, D., NALLIN, M. & KAPLAN, L.: Avermectin B_2 O-Methyltransferase activity in "Streptomyces avermitilis" mutants that produce increased amounts of the avermectins.
Antimicrob. Agents Chemother. 29, 620 - 624 (1986a).

SCHULMAN, M.D., VALENTINO, D. & HENSENS, O.: Biosynthesis of the Avermectins by Streptomyces avermitilis. Incorporation of labeled precursors.
J. Antibiot. 39, 541 - 549 (1986b).

SENO, E.T. & BALTZ, H.: Properties of S-adenosyl-L-methionine: macrocin O-methyltransferase in extracts of Streptomyces fradiae strains which produce normal or elevated levels of Tylosin and in mutants blocked in specific O-methylations.
Antimicrob. Agents Chemother. 20, 370 - 377 (1981).

SENO, E.T. & BALTZ, R.H.: S-adenosyl-L-methionine: macrocin O-methyltransferase activities in a series of Streptomyces fradiae mutants that produce different levels of the macrolide antibiotic Tylosin.
Antimicrob. Agents Chemother. 21, 758 - 763 (1982).

SENO, T.E. & HUTCHINSON, C.R.: The biosynthesis of Tylosin and Erythromycin: model systems for studies of the genetics and biochemistry of antibiotic formation.
In: The Bacteria, Vol. IX, Chapt. 7, GUNSALUS, J.C. (Ed.), Academic Press, New York (1986).

SETO, H., AKAO, H., FURIHATA, K. & OTAKE, N.: The structure of a new antibiotic, Hygrolidin.
Tetrahedron Lett. 23, 2667 - 2670 (1982).

SETO, H., TAJIMA, I., AKAO, H., FURIHATA, K. & OTAKE, N.: The isolation and structures of Hygrolidin amide and Defumarylhygrolidin.
J. Antibiot. 37, 610 - 613 (1984).

TANAKA, Y., TAKAHASHI, Y., MASUMA, R., IWAI, Y., TANAKA, H. & OMURA, S.: Enhancement and cultural characteristics of Leucomycin production by Str. kitasatoensis in the presence of magnesium phosphate
Agric. Biol. Chem. 45, 2475 - 2481 (1981).

TANAKA, Y., TAKI, A., MASUMA, R. & OMURA, S.: Mechanism of nitrogen regulation of Protylonolide biosynthesis in Streptomyces fradiae.
J. Antibiot. 39, 813 - 821 (1986).

THOMPSON, C.J., WARD, J.M. & HOPWOOD, D.A.: Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes.
J. Bacteriol. 151, 668 - 677 (1982).

VEDEL, M., LAWRENCE, F., ROBERT-GERO, M. & LEDEVER, E.: The antifungal Sinefungin as a very active inhibitor of methyltransferases and of the transformation of chick embryo fibroblasts by Rous sarcoma virus.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 371 - 376 (1978).

WALZ, F.: Studien zur Fermentation neuer Nikkomycine mit freien und immobilisierten Zellen.
Dissertation Universität Tübingen (1986).

WEBER, J.M., WIERMAN, C.K. & HUTCHINSON, C.R.: Genetic analysis of Erythromycin production in Streptomyces erythreus.
J. Bacteriol. 164, 425 - 433 (1985).

WERNER, G.: Strukturaufklärung neuer Antibiotika.
Dissertation Universität Tübingen (1981).

WERNER, G., HAGENMAIER, H., ALBERT, K., KOHLSHORN, H. & DRAUTZ, H.: The structure of the Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics.
Tetrahedron Lett. 24, 5193 - 5196 (1983).

WERNER, G. & HAGENMAIER, H.; DRAUTZ, H., BAUMGARTNER, A. & ZÄHNER, H.: Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics.
J. Antibiot. 37, 110 - 117 (1984).

WERNER, R.: Antibiotisch aktive Sekundär-Metaboliten aus dem Primär-Stoffwechsel aromatischer Aminosäuren.
Habilitationsschrift Universität Tübingen (1982).

WILTON, J.H., HOKANSON, G.C. & FRENCH, J.C.: PD 118,576: A new antitumor macrolide antibiotic.
J. Antibiot. 38, 1449 - 1452 (1985).

WOODWARD, R.B.: Struktur und Biogenese der Makrolide. Eine neue Klasse von Naturstoffen.
Angew. Chemie 69, 50 - 58 (1957).

YAMAMOTO, H., NAKAZAWA, K., HORII, S. & MIYAKE, A.: Studies on agricultural antibiotic. Folimycin, a new antibiotic produced by Streptomyces neyagawaensis nov.sp..
Nippon Nogeikagaku Kaishi 34, 268 - 272 (1960).

ZÄHNER, H. & DRAUTZ, H.: Methods in the search for new metabolites from microorganism - a comparison.
VIIIth Internat. Symposium on Medicinal Chemistry Proc. Vol. 2, 49 - 68 (1985).

ZÄHNER, H. & MAAS, W.K.: Biology of antibiotics.
Springer Verlag, Berlin (1972).

ZMIJEWSKI, M.J., BRIGGS, B. & OCCOLOWITZ, J.: Role of branched chain fatty acid precursors in regulation factor profile in the biosynthesis of A21978 C complex.
J. Antibiot. 39, 1483 - 1485 (1986).

Lebenslauf:

20.12.1959	geboren in Riedlingen
1966 - 1969	Grundschule in Riedlingen
1969 - 1978	Kreisgymnasium in Riedlingen
19.05.1978	Reifeprüfung
ab WS 1978	Biologiestudium (Diplom) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
21.7.1980	Diplom-Vorprüfung
29.6.1984	Diplom-Hauptprüfung
ab 1.7.1984	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner
ab 1.9.1986	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Biologie II bei Herrn Prof. Dr. H. Zähner

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, H. Anke, F. W. Bentrup, W. U. Berthold, W. Bessler, V. Braun, D. Bunke, W. Engels, H. P. Fiedler, E. Fischer, G. Forkmann, K. Grell, J. Guglielmi, A. Hager, K. Hantke, J.V. Höltje, C. Jönsson, G. Jung, O. Klee, H. Kneifel, W. Loeffler, H. Netzel, K. Poralla, H. Probst, W. Rähle, A. Rieker, B. Röttger, B. Schwemmle, U. Seitz, W. Seyffert, J. Strähle, H. Tichy, R. Werner, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Wolf, H. Zähner, A. Ziegler

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel. 0 61 51 / 21 3 53